

Nathalya Cristina Lavelle

**Bases Moleculares e Aspectos Diagnósticos das Talassemias Alfa
e Beta no Brasil**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo - Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

São Paulo

2019

Nathalya Cristina Lavelle

**Bases Moleculares e Aspectos Diagnósticos das Talassemias Alfa
e Beta no Brasil**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo - Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Orientador:

Prof. Dr. Edgar Gil Rizzatti

São Paulo

2019

Lavelle, Nathalya Cristina

Bases Moleculares e Aspectos Diagnósticos das Talassemias Alfa e Beta no Brasil/ Nathalya Cristina Lavelle. - São Paulo, 2019.

xvi, 101 f.

Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação: Medicina (Hematologia e Oncologia).

Título em inglês: Molecular Basis and Diagnostic aspects of Alpha and Beta Thalassemias in Brazil.

1. Talassemia. 2. Alfa e Beta-Talassemia. 3. Diagnóstico Molecular

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO MEDICINA
HEMATOLOGIA E ONCOLOGIA

Chefe do Departamento: Profa. Dra. Maria Stella Figueiredo

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Profa. Dra. Gisele Colleoni

Nathalya Cristina Lavelle

Bases Moleculares e Aspectos Diagnósticos das Talassemias Alfa e Beta no Brasil

Presidente da Banca:

Profa. Dra. Gisele Wally Braga Colleoni

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati

Prof. Dr. Rodolfo Delfini Cançado

Profa. Dra. Maria Stella Figueiredo

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Aurelio e Rosangela,
com extrema gratidão*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por iluminar meus caminhos e por sempre me dar forças para continuar.

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Edgar Gil Rizzatti, meus sinceros agradecimentos, pela confiança em me receber como sua aluna, pelo incentivo e apoio irrestritos, e pelos preciosos ensinamentos. “Uns são homens, alguns são professores, poucos são mestres. Aos primeiros, escuta-se; aos segundos, respeita-se, aos últimos, segue-se”.

À minha querida coorientadora, Profa. Dra. Ana Maria Fraga, pela pronta disponibilidade em participar deste projeto, pela inestimável ajuda, por compartilhar com tanto carinho seus conhecimentos, e pela lindíssima amizade que transcendeu amplamente a relação aluna-professora.

À minha querida coorientadora, Profa. Dra. Maria Carolina Tostes Pintão, pelo imensurável incentivo desde o início deste projeto. Pela confiança e amizade. Há pessoas que marcam a nossa vida, que despertam algo especial em nós, que abrem nossos olhos de modo irreversível e transformam à nossa maneira de ver o mundo. Você é essa pessoa.

Ao meu amado pai, Aurelio, por ser meu porto seguro.

À minha amada mãe e melhor amiga, Rosangela, por toda dedicação e cuidado. Por ser esse exemplo de amor e bondade. Sem você ao meu lado, nada disso teria sentido.

Ao meu irmão, Julio Cesar Lavelle, que mesmo de longe torceu pela realização deste trabalho.

Ao Daniel, pelo apoio e companheirismo incondicionais. Obrigada por estar sempre ao meu lado com este sorriso lindo que ilumina minha vida.

Ao meu querido primo-irmão, Victor Thomaz, pelo incontestável apoio nesta importante etapa da minha vida. Obrigada por dividir comigo sua casa em inúmeros momentos, por estar sempre pronto para me ouvir e me ajudar.

Às minhas amadas amigas, Ariane e Thamires, por estarem sempre presentes em minha vida, por todo incentivo, amor e por acreditarem fielmente em meu trabalho.

Às minhas queridas amigas, Carol Mônaco, Edna Reis, Ellen Martins, Jaciara de Assis, Natalia Dallaval, Monica Belmonte, Simone Zillig e Veronica Paz, por todo apoio, carinho e atenção nestes anos de mestrado. Vocês fazem parte da minha história, sou muito grata por tê-las em minha vida.

À toda equipe do setor de P&D do Grupo Fleury, por tanto conhecimento compartilhado, confiança no meu trabalho e imensurável apoio financeiro. Em especial, agradeço a querida Ana Leones, por toda ajuda e dedicação com as compras de insumos; aos queridos Alexandre Fornari e Luciana Peniche pela inestimável ajuda e apoio constante, e ao Valdemir Melechco, pelas preciosas conversas.

À toda equipe do setor de Biologia Molecular do Grupo Fleury, por terem me recebido com tanto carinho, por tanta disponibilidade e amor em compartilhar conhecimento. Agradeço de forma especial às queridas Anne de Sena, Carol Pugliese, Patrícia Sacramento, Rafaela Souza, Vanessa Cantagalli e Vanessa Yuri.

Aos queridos médicos do Grupo Fleury, Dr. Alex Sandes, Dra. Christiane Gouveia e Dr. Matheus Vescovi, pelo infinito incentivo.

À toda equipe da Unifesp, e a Maria Helena pela colaboração e esclarecimentos prestados.

Ao Grupo Fleury, por acreditar no meu trabalho e por sempre me incentivar a ir mais além.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Muito obrigada!

Sumário

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Estrutura e síntese da hemoglobina.....	1
1.2 Hemoglobinopatias	3
1.3 Talassemias	6
1.3.1 Alfa-Talassemias: aspectos gerais	7
1.3.2 Beta-Talassemias: aspectos gerais	10
1.4 Diagnóstico molecular das alfa- e beta-talassemias	12
1.4.1 A técnica de MLPA	13
1.5 Estudos sobre as alfa- e beta-talassemias no Brasil	15
2 OBJETIVOS	19
3 PACIENTES E MÉTODOS.....	20
3.1 Hemograma e eletroforese de hemoglobinas	20
3.2 Dosagem de ferritina.....	21
3.3 Extração de DNA	21
3.4 Validação do método Gap-PCR Multiplex.....	21
3.5 Validação do método MLPA (Multiplex Ligation -Dependent Probe Amplification)	23
3.5.1 Preparo das amostras.....	24
3.5.2 Reação de desnaturação do DNA e hidridização com o mix de sondas....	24
3.5.3 Reação de ligação	25
3.5.4 Reação de PCR.....	25
3.5.5 Separação dos produtos amplificados no sequenciador.....	26
3.6 Validação do sequenciamento de DNA - método de Sanger.....	26
3.6.1 Reação de PCR.....	27
3.6.2 Reação de sequenciamento	28
3.6.3 Reação de precipitação	28
3.6.4 Eletroforese capilar	28
3.7 Análise estatística	29
4 RESULTADOS	30
4.1 Grupo 1: Casos sugestivos de beta-talassemia	31

4.2 Grupo 2: Casos sugestivos de alfa-talassemia	37
4.3 Comparação das talassemias alfa e beta	45
5 DISCUSSÃO	48
5.1 Correlação das alterações moleculares com o perfil hematológico nas talassemias alfa e beta	51
6 CONCLUSÕES	56
7 REFERÊNCIAS	58
ANEXOS	
APÊNDICES	

Lista de figuras

Figura 1. Produção das cadeias globínicas.....	2
Figura 2. Representação dos clusters alfa e beta e seus elementos regulatórios.....	3
Figura 3. Fisiopatologia das talassemias	7
Figura 4. Representação esquemática das deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$	9
Figura 5. Representação esquemática das sondas utilizadas no ensaio de MLPA ..	14
Figura 6. Representação esquemática das sondas no cluster e genes HBA.	25
Figura 7. Ciclos de amplificação dos fragmentos de MLPA	26
Figura 8. Representação esquemática da localização dos primers no gene HBB	27
Figura 9. Delineamento do estudo.	30
Figura 10. Eletroforese de hemoglobinas com aumento da fração de Hb A2	32
Figura 11. Produtos da amplificação dos 3 éxons do gene HBB.....	32
Figura 12. Perfil de eletroforese capilar do paciente 3, mutação CD 39	34
Figura 13. Perfil de eletroforese capilar do paciente 2, mutação IVS-I-6	34
Figura 14. Perfil de eletroforese capilar do paciente 15, mutação IVS-I-110	34
Figura 15. Perfil de eletroforese capilar do paciente 266, mutação c.126_127	35
Figura 16. Representação esquemática da comparação dos perfis, hematológico e de hemoglobinas, entre as mutações causadoras de beta-talassemia (CD 39, IVS-I-110 e IVS-I-6) mais prevalentes nos pacientes do grupo 1.....	37
Figura 17. Padrão de bandas após amplificação usando a técnica de Gap-PCR Multiplex..	38
Figura 18. Representação esquemática da comparação dos perfis, hematológico e de hemoglobinas, entre as deleções em homozigose e heterozigose, causadoras de alfa-talassemia.	42
Figura 19. Resultado de MLPA do paciente 60	43
Figura 20. Resultado de MLPA do paciente 61	43
Figura 21. Resultado de MLPA do paciente 275	44
Figura 22. Resultado de MLPA do paciente 44	44
Figura 23. Resultado de MLPA do paciente 396	45
Figura 24. Resultado de MLPA do paciente 190	45
Figura 25. Representação esquemática da comparação dos perfis, hematológico e de hemoglobinas, entre as talassemias alfa e beta.....	47

Lista de tabelas

Tabela 1. Primers utilizados para detecção das deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$	22
Tabela 2. SALSA P140 HBA	23
Tabela 3. Primers utilizados para amplificação das regiões alvo no gene <i>HBB</i>	27
Tabela 4. Confirmação de talassemias alfa e beta e “prevalência” por Estado.....	31
Tabela 5. Resultados do sequenciamento de DNA do gene <i>HBB</i>	33
Tabela 6. Descrição dos dados de idade, estado e sexo, dos casos sugestivos de beta-talassemia, segundo resultado do sequenciamento de DNA do gene <i>HBB</i>	35
Tabela 7. Perfil hematológico e de hemoglobinas dos casos sugestivos de beta-talassemia, segundo resultado do sequenciamento de DNA.	36
Tabela 8. Resultados da técnica de Gap-PCR Multiplex, para pesquisa de deleções causadoras de alfa-talassemia.	38
Tabela 9. Descrição dos dados de idade, estado e sexo, dos casos sugestivos de alfa-talassemia, segundo resultado da técnica de Gap-PCR Multiplex.	39
Tabela 10. Perfil hematológico e de hemoglobinas dos casos sugestivos de alfa-talassemia, segundo resultado da técnica de Gap-PCR Multiplex.	40
Tabela 11. Comparação do perfil hematológico da série vermelha, entre os pacientes positivos heterozigotos ou homozigotos, no teste de Gap-PCR Multiplex.	41
Tabela 12. Resultados da técnica de MLPA nas amostras Gap-PCR Multiplex negativas.	42
Tabela 13. Principais diferenças hematológicas entre as talassemias alfa e beta.	46

Resumo

Introdução: As talassemias são doenças caracterizadas por alterações no ritmo de síntese de uma ou mais cadeias de globinas, com consequente ausência ou redução do número de cadeias a serem formadas. A depender dos genes envolvidos, são denominadas alfa- ou beta-talassemias. Nas talassemias, o número de moléculas de hemoglobina por célula é limitado, causando a microcitose (diminuição do volume corpuscular médio (VCM) das hemácias). A microcitose é comum na prática clínica e suas principais causas são: anemia ferropriva, beta talassemia e anemia da doença crônica. Chamou-nos a atenção, na rotina do setor de Hematologia do Laboratório Central do Grupo Fleury, localizado na cidade de São Paulo, SP, o elevado número de casos com microcitose, concentração de Hb A2 e perfil de ferritina normais. Essa observação sugere que os métodos de triagem empregados no diagnóstico das alfa-talassemias podem não estar refletindo sua real ocorrência. Adicionalmente, a grande quantidade de casos com elevação de Hb A2 e microcitose, sugerindo beta-talassemia, foi digna de nota. No Brasil, alguns estudos envolvendo métodos moleculares para diagnóstico das talassemias foram realizados, entretanto, a maioria desses estudos limitou-se a regiões específicas do país. **Objetivos:** Investigar por métodos moleculares a ocorrência da alfa-talassemia em pacientes com microcitose sem causas óbvias; identificar a presença de mutações causadoras de beta-talassemia nos pacientes com microcitose e elevação de Hb A2, e determinar a prevalência de ambas as condições em diferentes regiões do Brasil. Correlacionar os achados moleculares com o perfil hematológico da série vermelha e de hemoglobinas, das alfa- e beta-talassemias. **Pacientes e Métodos:** No período de 15 de fevereiro a 1 de junho de 2016, foram analisadas 4815 amostras do setor de Hematologia, provenientes dos estados: Bahia, Distrito Federal, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo. Excluiu-se 314 amostras devido à idade dos pacientes ser inferior a 2 anos. Nas 4501 amostras restantes, aplicou-se os critérios de inclusão para quadros sugestivos de alfa- ou beta-talassemias, respectivamente: combinação de microcitose e dosagem de Hb A2 normal (2,0% a 3,5%) ou diminuída (<2,0%), e dosagem de ferritina normal; ou presença de microcitose e dosagem de Hb A2 aumentada (>3,5%). Foram elegíveis 500 amostras consecutivas, sendo 208 sugestivas de beta-talassemia, e 292 sugestivas de alfa-talassemia. As técnicas de Gap-PCR Multiplex e Amplificação de Múltiplas Sondas Dependente de Ligação (MLPA) foram utilizadas para os casos com suspeita de alfa-talassemia, e o sequenciamento de DNA pelo método de Sanger para os casos sugestivos de beta-talassemia. **Resultados:** Identificaram-se 194 casos (93,3%) positivos para beta-talassemia, com 15 tipos de mutações, sendo as mais frequentes: CD 39 em 42,3% dos casos; 19,2% de IVS-I-6, e 17,3% da mutação IVS-I-110. Dentre elas, houve diferença nos índices de VCM e dosagem de Hb A2 ($p < 0,001$). A alfa-talassemia foi confirmada em 180 casos (61,6%) submetidos ao teste de Gap-PCR Multiplex; 112 casos (38,4%) foram negativos. Dentre os casos positivos, 126 indivíduos apresentaram deleções em heterozigose ($-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$, e $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$), e outros 54, deleção $-\alpha^{3.7}$ em homozigose. Os pacientes homozigotos apresentaram maior índice de microcitose ($p < 0,001$) quando comparados aos heterozigotos. As amostras de indivíduos com resultado negativo no Gap-PCR, foram submetidas ao teste de MLPA. Dos 112 casos avaliados, encontrou-se 9 positivos ($--MED$, $--HS-40$, $\alpha\alpha\alpha$ anti $\alpha^{3.7}$). Dentre os Estados avaliados, o Paraná apresentou maior frequência de alfa-talassemia, e o Rio Grande do Sul de beta-talassemia. **Conclusões:** A grande quantidade de indivíduos diagnosticados com alfa-talassemia neste estudo (64,7%), indica que essa condição

é subdiagnosticada no Brasil, e ressalta a importância da análise molecular para investigar as causas de microcitose nos casos em que as hipóteses mais comuns tenham sido excluídas. A deleção $-\alpha^{3.7}$ representou a maior causa de alfa-talassemia (94,7%), tendo sido identificada na Bahia, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo. As diferenças no perfil hematológico e no perfil de hemoglobinas observadas nas mutações CD 39, IVS-I-6, IVS-I-110 causadoras de beta-talassemia, assim como nos casos de alfa-talassemia em heterozigose e homozigose, indicam que os genótipos influenciam o quadro clínico-laboratorial. Este estudo é pioneiro em investigar o perfil laboratorial e molecular das alfa- e beta-talassemias nas diferentes regiões do Brasil.

Abstract

Introduction: Thalassemias are diseases characterized by changes in the rhythm of synthesis of one or more chains of globins, with consequent absence or reduction of the number of chains to be formed. Depending on the genes involved, they are called alpha- or beta-thalassemias. In thalassemias, the number of hemoglobin molecules per cell is limited, causing microcytosis (decrease in mean corpuscular volume (MCV) of red blood cells). Microcytosis is common in clinical practice and its main causes are: iron deficiency anemia, beta thalassemia and anemia of chronic disease. The high number of cases with microcytosis, normal A2 hemoglobin (Hb A2) concentration, and normal ferritin profile was noticed in the routine of the Hematology sector of the Fleury Group Central Laboratory, São Paulo, SP, Brazil. This observation suggests that the screening methods employed in the diagnosis of alpha-thalassemias may not be reflecting their actual occurrence. Additionally, the large number of cases with elevation of Hb A2 and microcytosis, suggesting beta-thalassemia, was noteworthy. In Brazil, some studies involving molecular methods for the diagnosis of thalassemias were performed; however, most of those studies were limited to specific regions of the country. **Objectives:** To investigate by molecular methods the occurrence of alpha-thalassemia in patients with microcytosis without obvious causes; to identify the presence of beta-thalassemia mutations in patients with microcytosis and Hb A2 elevation, and to determine the prevalence of both conditions in different regions of Brazil. Also, to correlate the molecular findings with the hematological profile of the red series and hemoglobins, alpha- and beta-thalassemias. **Patients and Methods:** In the period from February 15 to June 1, 2016, 4815 samples from the Hematology sector were analyzed, from Bahia, Distrito Federal, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul and São Paulo. Three hundred and fourteen samples were excluded because the patient's age was less than 2 years old. In the remaining 4501 samples, the inclusion criteria were applied for suggestive alpha- or beta-thalassemia, respectively: combination of microcytosis and normal (2.0% to 3.5%) or decreased (<2,0%) Hb A2 concentration, and normal ferritin dosage; or presence of microcytosis and increased Hb A2 concentration (>3.5%). Five hundred consecutive samples were eligible, 208 of which were suggestive of beta-thalassemia and 292 suggestive of alpha-thalassemia. Multiplex Gap-PCR and Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) techniques were used for cases with suggestive alpha-thalassemia, and DNA sequencing for cases with suggestive beta-thalassemia. **Results:** A total of 194 (93.3%) beta-thalassemia positive cases were identified, with 15 types of mutations, the most frequent being: CD 39 in 42.3% of the cases; 19.2% IVS-I-6, and 17.3% of the IVS-I-110 mutation. Among these, there were differences in VCM indexes and Hb A2 concentration ($p < 0.001$). Alpha-thalassemia was confirmed in 180 cases (61.6%) submitted to the Multiplex Gap-PCR test; 112 (38.4%) were negative. Among the positive cases, 126 individuals had deletions in heterozygosity ($-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$, and $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$), and the other 54, deletion $-\alpha^{3.7}$ in homozygosity. The homozygous patients had a higher rate of microcytosis ($p < 0.001$) when compared to heterozygotes. Individuals with a negative Gap-PCR result were tested for MLPA. Of the 112 evaluated cases, 9 were positive ($--_{MED}$, $--_{HS-40}$, $\alpha\alpha$ anti $^{3.7}$). Among the evaluated States, Paraná presented a higher frequency of alpha-thalassemia, and Rio Grande do Sul of beta-thalassemia. **Conclusions:** The large number of individuals diagnosed with alpha-thalassemia in this study (64.7%) indicates that this condition is underdiagnosed in Brazil and stresses the importance of molecular analysis to investigate the causes of microcytosis in cases where the most common hypothesis

have been excluded. The $-\alpha^{3.7}$ deletion was the major cause of alpha-thalassemia (94.7%). It was identified in Bahia, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul and São Paulo. Differences in the hematological profile and hemoglobin profile observed in mutations for CD 39, IVS-I-6, IVS-I-110 causing beta-thalassemia, as well as in heterozygous and homozygous alpha-thalassemia cases, indicate that genotypes influence the clinical-laboratory situation. This study is pioneer in investigating the molecular and laboratorial profile of alpha- and beta-thalassemias in different regions of Brazil.

1 INTRODUÇÃO

As talassemias são doenças caracterizadas por alterações no ritmo de síntese de uma ou mais cadeias de globinas, com consequente ausência ou redução do número de cadeias a serem formadas. Essas alterações podem ocorrer devido a: deleção de genes que codificam a produção das globinas; mutações que resultam na diminuição da síntese, processamento ou estabilidade do transcrito (RNA); ou mutações resultantes da diminuição de síntese ou estabilidade proteicas. A depender dos genes envolvidos, as talassemias são denominadas alfa- ou beta-talassemias. A diminuição ou ausência da expressão de uma das cadeias de globina gera um excesso da globina correspondente codificada pelo gene não afetado. Esse desequilíbrio de cadeias alfa ou beta, limita o número de moléculas completas de hemoglobina (Hb) por célula, causando a microcitose, que é a diminuição do volume corpuscular médio (VCM) das hemácias. A microcitose é um dos principais achados laboratoriais observado nas talassemias.⁽¹⁾

1.1 Estrutura e síntese da hemoglobina

A hemoglobina é a principal proteína intracelular presente nas hemácias, e tem como função primordial o transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos, e dióxido de carbono dos tecidos para os pulmões.⁽²⁾ Trata-se de uma molécula tetramérica, composta por quatro cadeias globínicas, que podem ser do tipo α (alfa- α e zeta- ξ), composta por 141 aminoácidos, ou do tipo não α (beta- β , delta- δ , gama- γ , epsilon- ϵ), com 146 aminoácidos. Cada uma delas está ligada a um grupo prostético heme, formado por ferro e porfirina, sendo este o responsável por captar e liberar oxigênio aos tecidos.^(3, 4)

Ao longo do desenvolvimento humano, desde o período embrionário até a fase adulta, diferentes hemoglobinas são formadas em virtude da expressão seletiva dos genes que codificam as cadeias globínicas. Esses genes estão organizados em complexos multigênicos denominados *clusters*, que estão localizados em dois cromossomos distintos: o *cluster* α encontra-se no cromossomo 16, na sequência 5'- ξ - $\Psi\delta$ - $\Psi\alpha 2$ - $\Psi\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 1$ - θ - 3' (zeta – pseudo zeta – pseudo alfa 2 – pseudo alfa 1 – alfa 2 – alfa1 – teta 1); enquanto o *cluster* β encontra-se no cromossomo 11, constituído por cinco genes: 5'- ϵ - G γ - A γ - $\Psi\beta_1$ - δ - β -3' (épsilon –gama glicina – gama alanina – pseudo beta um – delta – beta) ⁽⁵⁾.

No início do desenvolvimento intra-uterino, três hemoglobinas embrionárias estão presentes, Gower 1 ($\xi_2\epsilon_2$), Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$) e Portland ($\delta_2\gamma_2$), que logo deixam de ser produzidas. Após essa fase, a síntese de cadeias ξ (zeta) e ϵ (épsilon) é interrompida, e se inicia a síntese da hemoglobina fetal ($\alpha_2\gamma_2$), que predomina durante toda a gestação. Após o nascimento, no período de três a seis meses, aproximadamente, a síntese de cadeias γ (gama) é amplamente substituída pela síntese de cadeias β (beta), e com isso a hemoglobina A ($\alpha_2\beta_2$) vai aumentando sua produção gradativamente (Figura 1). O mesmo ocorre com a síntese de cadeias δ (delta), que têm sua produção gradativamente aumentada após o nascimento, formando a segunda principal hemoglobina do adulto, a hemoglobina A2 ($\alpha_2\delta_2$). Assim, nos adultos, as hemoglobinas predominantes são designadas Hb A, Hb A2, e Hb Fetal. ⁽⁶⁻⁸⁾

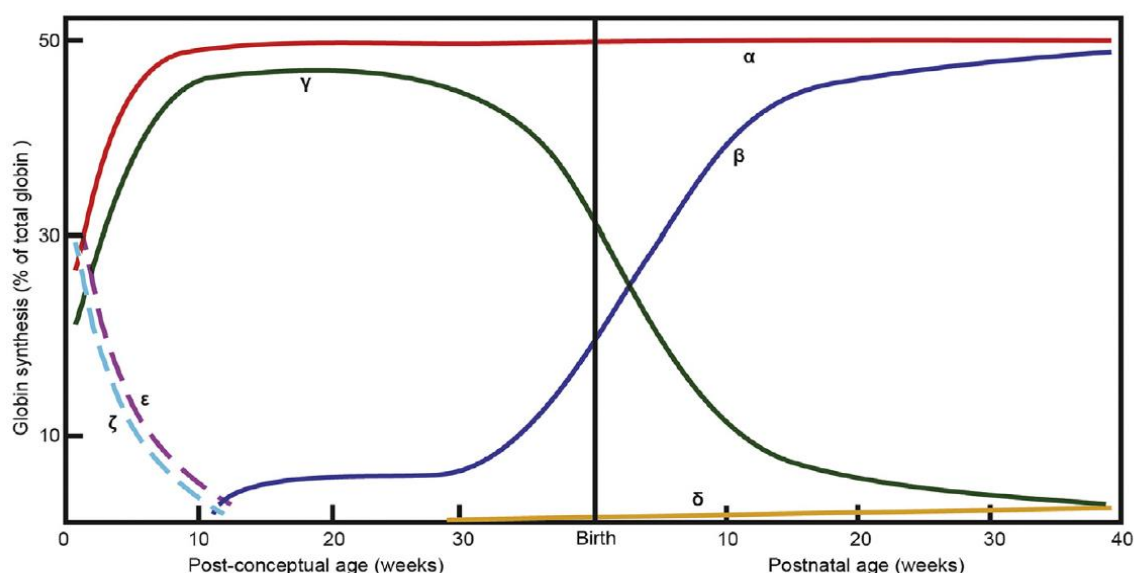


Figura 1. Produção das cadeias globínicas ao longo do tempo de vida em humanos. ⁽⁹⁾

A expressão dos genes de globina em ambos os *clusters* é controlada por elementos regulatórios localizados a 5' dos genes estruturais (Figura 2). No *cluster* α , o controle da expressão dos genes é realizado por 4 sítios regulatórios, situados entre 10 Kb e 48 Kb à montante do gene ξ embrionário. Esses sítios com sequências conservadas e hipersensíveis à DNase I, são referidos como sequências multiespécies conservadas (MCS -R1-R4). Apesar deste segmento de DNA ser composto por 4 sítios, apenas o MCS-R2 (antigamente conhecido como HS-40) é capaz de conduzir a síntese dos genes α , e por esse motivo é denominado elemento regulatório principal. Deleções do MCS-R2 culminam em uma importante diminuição

na expressão dos genes α para valores inferiores a 5%. A regulação da expressão dos genes alfa é controlada pelo elemento MCS-R2 e mediada por fatores de transcrição nas células eritroides, sendo que os principais fatores envolvidos são o GATA 1 e o fator nuclear eritroide 2 (NF-E2).⁽⁹⁻¹²⁾

Nos genes situados no *cluster* β , a expressão ocorre de forma similar aos genes α , e é mediada por 5 sítios hipersensíveis à DNase (HS 1-5), específicos de células eritroides. Este conjunto de 5 sítios, localizados de 4 a 20 kb à montante do gene ϵ , é chamado de β -LCR (*Locus Control Region*). A regulação da transcrição do gene *HBB* ocorre através da interação do β -LCR com sequências promotoras, incluindo TATA, CAAT e CACCC, e com os fatores de transcrição, GATA 1, NF-E2 e *Erythroid Krüppel Like Factor* (EKLF).^(13, 14)

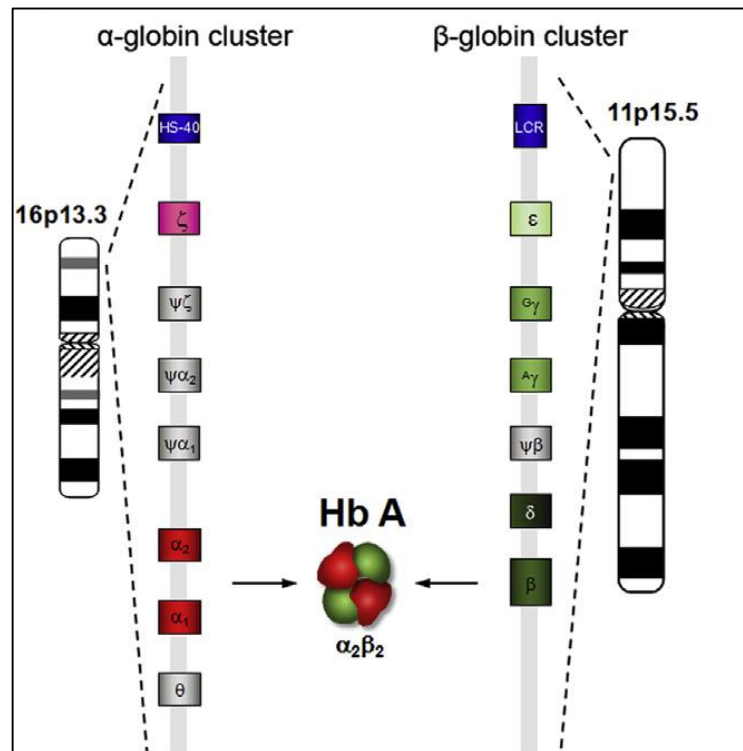


Figura 2. Representação dos *clusters* da alfa e beta globinas e seus elementos regulatórios. ⁽¹⁵⁾

1.2 Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias são condições hereditárias caracterizadas por mutações nos genes que codificam as cadeias globínicas. Essas mutações podem causar alterações qualitativas, pela substituição de aminoácidos que resultam no

aparecimento de hemoglobinas variantes; ou quantitativas, quando há redução na síntese de cadeias globínicas, dando origem às talassemias. ⁽¹⁶⁾

As hemoglobinopatias merecem lugar de destaque dentre as doenças genéticas mais prevalentes. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 270 milhões de pessoas em todo o mundo possuem genes que determinam a síntese de hemoglobinas anômalas em várias combinações, com consequências que variam de quase imperceptíveis a letais.⁽¹⁷⁾ Estudos epidemiológicos revelam que cerca de 300 a 400 mil crianças nascidas vivas por ano apresentam alguma forma grave dessa doença.^(18, 19) Estima-se que aproximadamente 3,4% das mortes em crianças menores de 5 anos estejam relacionadas com a herança genética de alguma hemoglobinopatia,⁽¹⁵⁾ e que cerca de 7% da população mundial carregue pelo menos uma mutação responsável pelo aparecimento desses distúrbios da hemoglobina. Dois grupos principais dividem as hemoglobinopatias: as variantes estruturais da hemoglobina (Hb variantes) e as talassemias. Ambas as condições seguem o padrão de herança autossômico recessivo, e são distribuídas mundialmente. ⁽²⁰⁾

Nas regiões do Mediterrâneo, África Subsaariana, Oriente Médio, leste e sudeste Asiático, e subcontinente Indiano, as talassemias e Hb variantes são altamente prevalentes. Contudo, nota-se que por conta da migração contínua das diferentes populações, essas doenças estão se tornando cada vez mais comuns em grandes cidades da Europa, América do Norte, entre outros lugares do mundo, tornando-se uma preocupação global de saúde. ⁽²¹⁾ Alguns autores apontam a teoria do efeito seletivo da malária para tentar justificar as altas prevalências das hemoglobinopatias. A malária é uma doença infecciosa, e grande parte do seu ciclo ocorre nos eritrócitos. Dado que as hemoglobinopatias causam alterações na estrutura e/ou função das hemoglobinas, acredita-se que indivíduos heterozigotos apresentem maior resistência à infecção pelo *Plasmodium falciparum* e, conseqüentemente, maior sobrevivência em áreas endêmicas de malária, como a região Mediterrânea, o Oriente Médio, Sudoeste da Ásia e África. ^(21, 22)

Em consulta ao HbVar (<http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter>), foram descritos 1.317 tipos de hemoglobinas variantes até 29 de abril de 2018. O HbVar é um banco de dados de hemoglobinas variantes e talassemias. Essa base de dados foi lançada em 2001 e rapidamente tornou-se um dos recursos mais utilizados pela comunidade científica nas pesquisas das mais diversas alterações genéticas das hemoglobinas. O HbVar foi desenvolvido para acompanhar a necessidade de

atualizações regulares de dados, como inserção de novas mutações e/ou deleções causadoras de hemoglobinas variantes e talassemias que são continuamente identificadas. ⁽²³⁾

Dentre os diversos tipos de Hb variantes descritas, as hemoglobinas S, C e E, estão entre as mais comuns e clinicamente significantes.⁽²⁰⁾ A Hb S é uma variante estrutural da Hb A, causada por uma mutação no gene *HBB*, que resulta na substituição do ácido glutâmico pela valina. Indivíduos heterozigotos são geralmente assintomáticos, enquanto os homozigotos apresentam condição clínica grave, denominada anemia falciforme. Esses pacientes frequentemente apresentam complicações agudas e crônicas, incluindo síndrome torácica aguda, crises vaso-oclusivas, crises hemolíticas, entre diversas outras complicações.⁽²⁴⁾ A Hb C é outra variante estrutural da Hb A, também causada por mutação no gene *HBB* com substituição do ácido glutâmico pela lisina. Os indivíduos que carregam a mutação em heterozigose são assintomáticos, mas aqueles que possuem herança homozigota dessa variante apresentam anemia hemolítica de grau moderado. A significância clínica da Hb C aumenta quando essa variante é herdada em combinação com a Hb S. A heterozigose composta dessas variantes origina a hemoglobinopatia SC, que cursa com crises hemolíticas crônicas e crises de falcização, porém, menos graves e frequentes do que as observadas nos pacientes com anemia falciforme.⁽²⁵⁾ A troca do aminoácido lisina pela ácido glutâmico no códon 26 do gene *HBB* resulta na formação da variante Hb E. O estado heterozigoto da Hb E é caracterizado por alterações mínimas ou ausentes na série vermelha, constituindo cerca de 25 a 30% do total de hemoglobinas. Já nos casos de homozigose, observa-se anemia microcítica e hipocrômica com inúmeras hemácias em alvo. ⁽²⁶⁾

No Brasil, historicamente, o processo de colonização com base escravocrata e posterior miscigenação racial teve enorme influência na distribuição de alelos alterados, levando a uma prevalência de hemoglobinopatias relativamente elevada. A dispersão de hemoglobinas anômalas em nosso meio está intimamente relacionada às diferentes etnias que compõem nossa população.^(27, 28) Entre os países da América Latina, o Brasil possui a maior população afro-americana e as maiores estimativas de casos de homozigose para Hb S, com aproximadamente 1 caso de anemia falciforme a cada 1000 recém-nascidos. A prevalência de recém-nascidos heterozigotos (AS), caracterizados como traço falciforme, é de aproximadamente 100 mil casos por ano.

As hemoglobinopatias são consideradas um problema de saúde pública, e por este motivo a Portaria do Ministério da Saúde Nº 822, de 06 de junho de 2001, regulamentou a triagem neonatal dessas doenças no Brasil. Essa medida proporcionou igualdade no acesso aos testes de triagem a todos recém-nascidos brasileiros, independentemente da origem geográfica, raça e classe socioeconômica. O diagnóstico precoce, a conscientização dos familiares, bem como o tratamento destas condições, permite maior qualidade de vida para os pacientes. ⁽³⁰⁾

1.3 Talassemias

O termo “talassemia” é derivado das palavras gregas “thalassa” (mar) e “haema” (sangue) e refere-se às doenças associadas com defeitos na síntese de globinas alfa ou beta, que formam a molécula de hemoglobina humana. As talassemias são doenças autossômicas recessivas, e estão entre as doenças monogênicas mais bem distribuídas mundialmente. Nos países do Mediterrâneo, Sudeste Asiático e Oriente Médio, essas condições são altamente prevalentes, entretanto, devido a migração generalizada das diferentes populações, atualmente as talassemias podem ser encontradas em todo o mundo. ⁽³¹⁾

A fisiopatologia dessas doenças tem como base o desequilíbrio na síntese das cadeias de globina alfa e beta. Tal desequilíbrio é caracterizado pela diminuição e produção ineficiente de moléculas de Hb, gerando hemácias microcíticas e hipocrômicas. O acúmulo de cadeias que apresentam sua síntese preservada, precipita-se na membrana das hemácias como agregados insolúveis levando a destruição precoce e significativa diminuição da sobrevivência dessas células. ⁽³²⁾ O espectro clínico das talassemias abrange desde portadores assintomáticos até pacientes com a forma grave da doença, que necessitam de transfusões periódicas de sangue e tratamentos com quelantes de ferro. O monitoramento adequado da sobrecarga de ferro nesses indivíduos é imprescindível, e melhora os aspectos relacionados com a qualidade de vida. Complicações de origem endócrina são comumente observadas nos casos graves de talassemia, e podem envolver glândulas como a hipófise, tireoide, paratireoide, e alguns órgãos, como o pâncreas. ⁽³³⁾ Os mecanismos, bem como as consequências observadas nos pacientes com talassemia, estão representados na Figura 3.

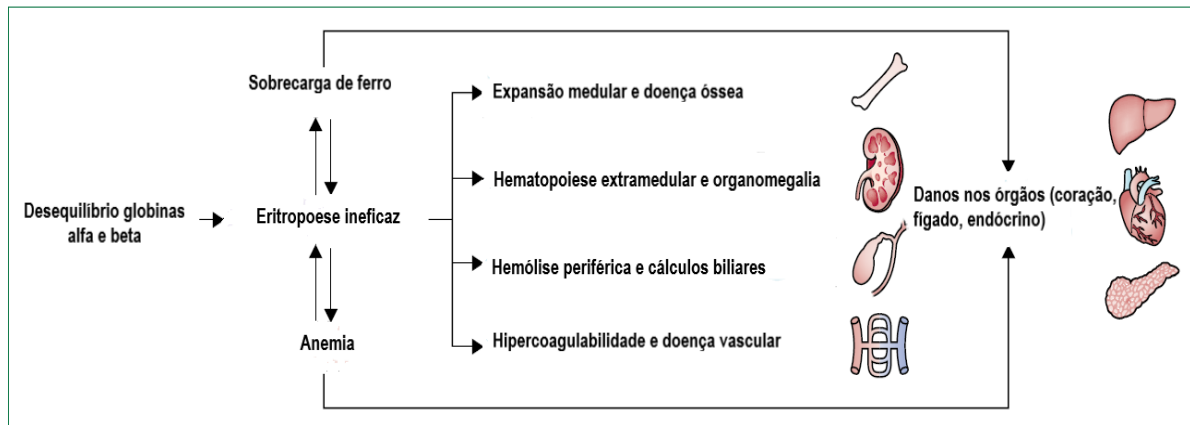


Figura 3. Fisiopatologia das talassemias. Adaptado de Wheaterall e colaboradores, 2018 ⁽²¹⁾

As talassemias podem ser co-herdadas com diferentes tipos de hemoglobinas variantes, e essas interações complexas dão origem a quadros extremamente amplos de fenótipos clínicos e hematológicos. Algumas interações como Hb S/beta-talassemia e Hb E/beta-talassemia estão associadas com enorme significância clínica.

(34)

1.3.1 Alfa-Talassemias: aspectos gerais

As alfa-talassemias são causadas por ausência ou diminuição da síntese de cadeias de globina alfa, decorrentes na maior parte dos casos de deleções nos genes estruturais (*HBA1* e *HBA2*). Mutações de ponto ou inserções de nucleotídeos, são causas menos frequentes denominadas de alfa-talassemia não-deleccional (α -tal não-deleccional). ⁽³⁵⁾ A Hb *Constant Spring* é um exemplo de α -tal não-deleccional, e ocorre devido a uma mutação no *códon* de terminação da cadeia alfa, resultando em um alongamento na síntese de globina alfa. Indivíduos heterozigotos para Hb *Constant Spring* são descritos como assintomáticos, enquanto os indivíduos homozigotos para a mutação apresentam anemia hemolítica moderada. ⁽³⁶⁾

A redução da síntese de cadeias de globina alfa resulta na formação de agregados de globina gama ou beta, pois estas encontram-se em excesso. Durante a vida fetal, o tetrâmero de gama globina é denominado de Hb Bart's (γ^4), e na fase pós-natal, o tetrâmero de beta, de Hb H (β^4). Ambas moléculas de Hbs Bart's e H possuem alta afinidade pelo oxigênio e por este motivo ocorre baixa entrega desse elemento químico nos tecidos. Além disso, o excesso de tetrâmeros formados também danifica os precursores eritroides em maturação, causando eritropoiese ineficaz. Os pacientes

com alfa-talassemia apresentam diferentes níveis de hemólise, que resultam da destruição precoce de eritrócitos com Hb Bart's e H. ⁽³⁷⁾

O genótipo de um indivíduo considerado normal, é caracterizado pela presença de quatro genes alfa ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), dois em cada cromossomo 16, sendo estes os responsáveis pela produção de globinas alfa. ⁽³⁸⁾ Os indivíduos afetados pela alfa-talassemia podem apresentar alterações nos testes laboratoriais, principalmente na análise da série vermelha e na eletroforese de hemoglobinas. Diversos níveis de Hb, que variam de normais até níveis muito baixos causando anemia hemolítica grave; valores reduzidos de VCM e HCM (menor em relação ao valor de referência de acordo com sexo e idade); contagem de eritrócitos normal ou aumentada, e dosagem de Hb A2 normal ou diminuída (a depender do número de genes alfa funcionais) são achados laboratoriais comumente observados. Os quatro diferentes fenótipos clínicos dessa doença são classificados em portador silencioso ($-\alpha/\alpha\alpha$), alfa-talassemia traço ($--/\alpha\alpha$ ou $-\alpha/-\alpha$), Doença de hemoglobina H ($--/-\alpha$) e Hidropsia fetal ($--/--$). A gravidade clínica está diretamente relacionada com o número de genes alfa afetados.

Como a célula diploide normal possui quatro genes α , as talassemias do tipo alfa são classificadas em α^+ ($-\alpha$) e α^0 ($--$) talassemia. Essa nomenclatura refere-se ao número de genes afetados no cromossomo, causando, respectivamente, redução parcial ou total da síntese de globinas alfa. ⁽³⁹⁾

1.3.1.1 Talassemia α^+

As formas mais comuns da talassemia α^+ envolvem a deleção de um dos genes α duplicados ($\alpha 1$ ou $\alpha 2$). O agrupamento dos genes α está localizado em regiões altamente homólogas de 4 Kb denominadas de X, Y e Z que são intercaladas por regiões curtas e não homólogas I, II e III. Devido ao alto grau de homologia dessas regiões o pareamento incorreto dos cromossomos é favorecido durante a meiose, provocando recombinação desigual dos genes α . Dentre as formas mais frequentes da talassemia α^+ destacam-se as deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$, ilustradas na Figura 4.

Na deleção $-\alpha^{3.7}$ os segmentos duplicados Z que possuem 3,7 Kb de distância um do outro, são pareados de forma incorreta (*crossing over* desigual), levando, portanto, a remoção de 3,7 Kb de DNA com resultante formação de um gene α híbrido ($\alpha 1\alpha 2$) em uma das fitas do cromossomo, e três genes α na fita complementar ($\alpha\alpha\alpha$ anti^{3.7}). Já na deleção $-\alpha^{4.2}$ ocorre o pareamento incorreto dos segmentos duplicados X que se encontram 4,2 Kb distantes um do outro, levando a remoção de 4,2 Kb de

DNA, com deleção total do gene $\alpha 2$, restando somente o $\alpha 1$ em um cromossomo e 3 genes α no outro ($\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$).⁽⁴⁰⁾

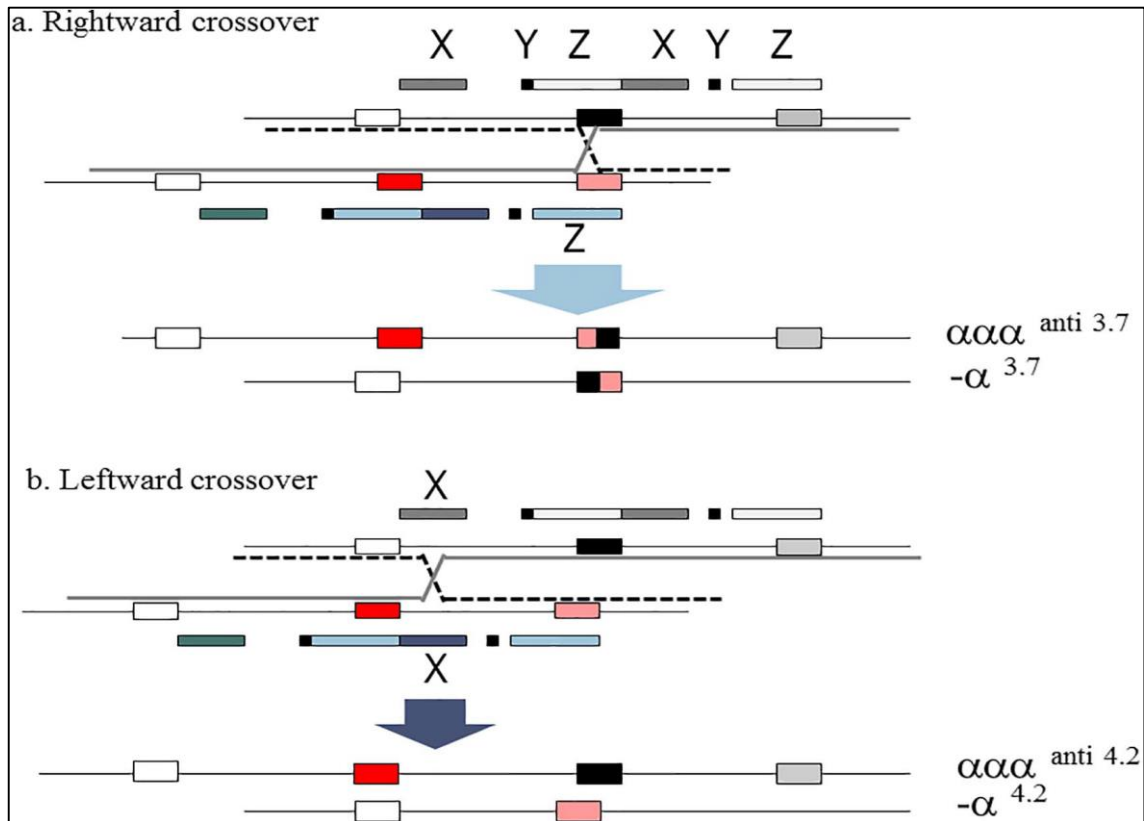


Figura 4. Representação esquemática do crossing over desigual dos cromossomos homólogos que culmina na formação das deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$, respectivamente. Neste evento, geram-se também os genótipos $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti3.7}}$ e $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti4.2}}$ (39)

1.3.1.2 Talassemia α^0

As talassemias α^0 , também conhecidas como alfa-talassemia traço, ocorrem devido a deleção de dois genes alfa (*HBA1* e *HBA2*) no mesmo cromossomo, ou seja, deleção em *cis* ($--/\alpha\alpha$). Diferentes tipos de α^0 talassemia foram descritos em diferentes populações. A nomenclatura dessas deleções ocorre geralmente de acordo com a localização geográfica e tamanho. Entre essas se destacam as deleções $--^{\text{SEA}}$ (Sudeste Asiático), $--^{\text{MED}}$ (Mediterrâneo), $--^{\text{FIL}}$ (Filipinas), $--^{\text{THAI}}$ (Tailândia) e $-(\alpha)^{20.5}$.⁽⁴¹⁾ Indivíduos com a condição α^0 apresentam anemia microcítica de grau moderado. O fenótipo clínico denominado Doença de Hb H deriva da heterozigose composta das deleções α^+ e α^0 . Nesse fenótipo ($--/\alpha$) observa-se anemia hemolítica de grau moderado, com intensa microcitose. Casais em que ambos são portadores

heterozigotos da alfa-talassemia traço podem originar um feto com a forma mais grave de alfa-talassemia, a Hidropsia Fetal (--/--).⁽⁴²⁾

1.3.2 Beta-Talassemias: aspectos gerais

As beta-talassemias são doenças hematológicas congênitas caracterizadas por ausência ou diminuição da produção de globinas beta.⁽⁴³⁾ Diferentes tipos de alterações moleculares, desde mutações de ponto, pequenas deleções no gene, ou deleções extensas envolvendo todo o *cluster HBB* podem causar beta-talassemia. Todavia, em contraste com a alfa-talassemia onde as deleções são apontadas como principais causas, na talassemia do tipo beta observa-se que a grande maioria das alterações moleculares são não-delecionais.⁽⁴⁴⁾

Geneticamente, as beta-talassemias são classificadas de acordo com o resultado da alteração molecular. Mutações ou deleções que levam à completa ausência da síntese de cadeias beta, decorrentes da inativação do gene *HBB*, são definidas como β^0 . Quando a síntese de cadeias beta é mantida, porém, de forma parcial, a definição utilizada é de β^+ e β^{++} . A nomenclatura β^+ representa os casos com grau significativo de redução de síntese. Já a β^{++} refere-se aos casos em a redução é menos significativa. Os achados clínicos dessa hemoglobinopatia variam de forma considerável, desde indivíduos assintomáticos, até aqueles dependentes de transfusão de concentrado de hemácias para garantir a sua sobrevivência, com comprometimento de múltiplos órgãos.⁽⁴⁵⁾ As alterações moleculares no gene *HBB* podem afetar as etapas de transcrição e tradução, assim como a estabilidade do transcrito formado. Defeitos na tradução, que resultam no genótipo β^0 são decorrentes de mutações *nonsense*, em que um *stop* códon é inserido de forma prematura no transcrito, resultando em uma cadeia não funcional; ou de mutações do tipo deleção e inserção que causam mudanças no quadro de leitura (*frameshift*), com alteração pontual na região codificante, mas que gera alteração na sequência de aminoácidos. Mutações que interferem no início da transcrição, na tradução do transcrito da beta globina ou na estabilidade do produto após a tradução estão relacionadas com o genótipo β^+ ⁽⁴⁶⁾

A partir dos dados clínicos, moleculares e laboratoriais, as beta-talassemias são divididas em três grupos: beta-talassemia maior (BTM), também conhecida como anemia de *Cooley*; beta-talassemia intermediária (BTI), e, beta-talassemia menor

(BTT), frequentemente referida como beta-talassemia traço ou beta-talassemia heterozigota. ⁽⁴⁷⁾

1.3.2.1 Beta-talassemia maior (BTM)

Os pacientes com BTM são incapazes de produzir moléculas de Hb normais e por este motivo são dependentes de transfusões sanguíneas por toda vida. Devido à ausência de Hb A, o quadro clínico destes pacientes se instala nos primeiros meses após o nascimento. Inúmeras complicações na saúde e qualidade de vida são descritas nos pacientes com BTM, tais como disfunção endócrina, problemas renais e de crescimento, sobrecarga de ferro devido aos repetidos episódios de transfusão sanguínea, dentre outras. ⁽⁴⁸⁾

Os principais achados na eletroforese de Hbs nos pacientes com BTM são a presença de níveis elevados de Hb F, geralmente acima de 94%, e níveis também elevados de Hb A2, acima de 5,0%. Na análise da série vermelha, os índices de VCM aparecem extremamente baixos, e a microcitose nesses pacientes é intensa. Na ausência de transfusões de concentrado de hemácias, os níveis de Hb desses indivíduos são acentuadamente baixos (<7 g/dL). ⁽⁴⁹⁾

1.3.2.2 Beta-talassemia intermediária (BTI)

A BTI é uma condição clínica de gravidade intermediária quando comparada com os tipos de beta-talassemia traço e maior. A diversidade clínica observada nos pacientes com BTI é bastante ampla. Enquanto alguns indivíduos apresentam-se de forma assintomática, outros cursam com anemia grave, com níveis acentuadamente baixos de hemoglobina. Essa diferença provém da base genética da BTI, que é extremamente heterogênea e está associada com a herança de um (β/β^+) ou dois alelos mutantes (β^+/β^+). ⁽⁵⁰⁾

A eritropoese ineficaz que ocorre nessa condição talassêmica promove maior absorção de ferro. O aumento de absorção culmina na maior complicação dos pacientes com BTI: a sobrecarga de ferro. O excesso de ferro é altamente tóxico e prejudicial a todas as células do organismo, causando, em muitos casos, danos irreversíveis, como cirrose hepática, diabetes, doenças cardíacas, dentre outros. Esses pacientes frequentemente necessitam de tratamentos com quelantes de ferro

para evitar essas complicações. ⁽⁵¹⁾ A diferenciação correta entre BTI e BTM é imprescindível, pois permite uma abordagem terapêutica individual e precisa para cada paciente. O diagnóstico precoce da BTI previne transfusões sanguíneas desnecessárias, bem como outras complicações relacionadas à transfusão. Já o diagnóstico precoce da BTM permite o início correto das transfusões de sangue, diminuindo dessa forma o risco de hiperesplenismo. O diagnóstico diferencial destes tipos de talassemia inclui a caracterização molecular do gene *HBB*. ⁽⁵⁰⁾

1.3.2.3 Beta-talassemia menor (BTT)

A BTT é a forma clínica mais branda da Beta-Talassemia. Os indivíduos acometidos são usualmente assintomáticos, com níveis de hemoglobina normais ou discretamente diminuídos, que variam entre 10-12 g/dL. Vários parâmetros hematológicos são normais, com exceção dos valores de VCM, que se apresentam abaixo do valor de referência, e do número de eritrócitos, que geralmente é mais elevado do que em indivíduos normais.

Esse tipo de talassemia é frequentemente confundida com a anemia ferropriva na prática clínica e laboratorial, pois em ambas as situações os pacientes cursam com microcitose. Entretanto, o diagnóstico da BTT pode ser facilmente estabelecido por meio da dosagem de Hb A₂, que se apresenta com valores aumentados (>3,5%), diferentemente do observado nos pacientes com anemia por deficiência de ferro, em que os valores são normais ou diminuídos. ⁽⁵²⁾

1.4 Diagnóstico molecular das alfa- e beta-talassemias

O diagnóstico molecular das talassemias é aplicado principalmente para a confirmação dos resultados da triagem clínica e laboratorial, bem como para o esclarecimento de casos complexos, e no diagnóstico pré-natal. É recomendado que os casos de triagem positivos sejam confirmados por meio de metodologia molecular, e os resultados devem ser interpretados em conjunto com a avaliação hematológica e história familiar de cada paciente, quando possível. O emprego de testes moleculares também é útil na pesquisa da co-herança de talassemias com outras Hbs anômalas. Mais de 400 mutações de talassemias já foram descritas e registradas no banco de dados de hemoglobinopatias, o HbVar, sendo as mutações pontuais e as grandes deleções e duplicações as principais alterações moleculares das talassemias

alfa e beta. Apesar da ampla diversidade de mutações, existem populações com registros específicos de mutações e deleções de talassemias. Por isso, as informações sobre a origem étnica dos pacientes podem facilitar a seleção da melhor estratégia diagnóstica.

Os métodos diagnósticos moleculares para as talassemias alfa e beta são altamente variáveis. Essa gama de opções é um reflexo da ampla base mutacional observada nessas doenças. Atualmente, alguns laboratórios estão empregando o sequenciamento de nova geração (NGS) em busca de mutações pontuais, deleções, inserções e translocações no genoma inteiro. Entretanto, os métodos de triagem rápida, como o GAP-PCR Multiplex, o MLPA, e o sequenciamento direto de DNA por Sanger, são preferencialmente utilizados nos centros de diagnóstico devido a sua enorme especificidade e eficiência, além de custo baixo quando comparado ao NGS. A técnica de GAP-PCR Multiplex é a primeira linha de escolha para diagnóstico molecular das talassemias do tipo alfa, pois grande parte das deleções causadoras desta doença podem ser facilmente detectadas por esta técnica, que é relativamente simples e barata. Tanto o MLPA quanto o sequenciamento por eletroforese capilar (Sanger) são capazes de revelar mutações desconhecidas. O teste molecular pode ser considerado como diagnóstico definitivo das talassemias. (39, 53)

1.4.1 A técnica de MLPA

A técnica denominada *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (Amplificação de Múltiplas Sondas Dependente de Ligação) é um método de PCR em *Multiplex* de alta sensibilidade, cujo objetivo é a quantificação relativa do número de cópias de até 50 sequências de ácidos nucleicos em uma única reação, sendo capaz de detectar duplicações e deleções em diversos genes, além de mutações de ponto conhecidas, e também realizar a análise de padrões aberrantes de metilação. Descrita pela primeira vez por Schouten e colaboradores, a técnica de MLPA tem como base um princípio simples, em que uma amostra de DNA genômico é hibridizada com um conjunto de sondas, com posterior amplificação dos produtos de ligação por PCR, utilizando-se um par de *primers* universal. Os fragmentos finais são separados e analisados em equipamento de eletroforese capilar, sendo então possível a quantificação relativa de cópias gênicas. (54, 55)

Essa técnica é composta por cinco etapas: desnaturação do DNA genômico, hibridização com o conjunto de sondas, reação de ligação, reação de amplificação

(PCR) e separação dos produtos amplificados por eletroforese capilar. As sondas utilizadas no ensaio de MLPA são formadas por dois oligonucleotídeos que se anelam de forma adjacente ao DNA, e são construídos da seguinte forma:

Sonda A (esquerda): oligonucleotídeo sintético curto, possui sequência homóloga ao *primer* universal *sense* (que contém um marcador fluorescente para reconhecimento – em azul, Figura 5), seguido por uma sequência de hibridização específica ao DNA-alvo (em vermelho, Figura 5).

Sonda B (direita): oligonucleotídeo longo, que contém uma sequência específica ao alvo (em vermelho, Figura 5), seguida de uma sequência-coringa (apresenta extensão diferente para cada sonda, o que definirá o tamanho exato a partir do qual o fragmento final poderá ser diferenciado dos demais - em verde, Figura 5), e por fim, uma sequência homóloga ao *primer* universal *antisense* (em laranja, Figura 5).

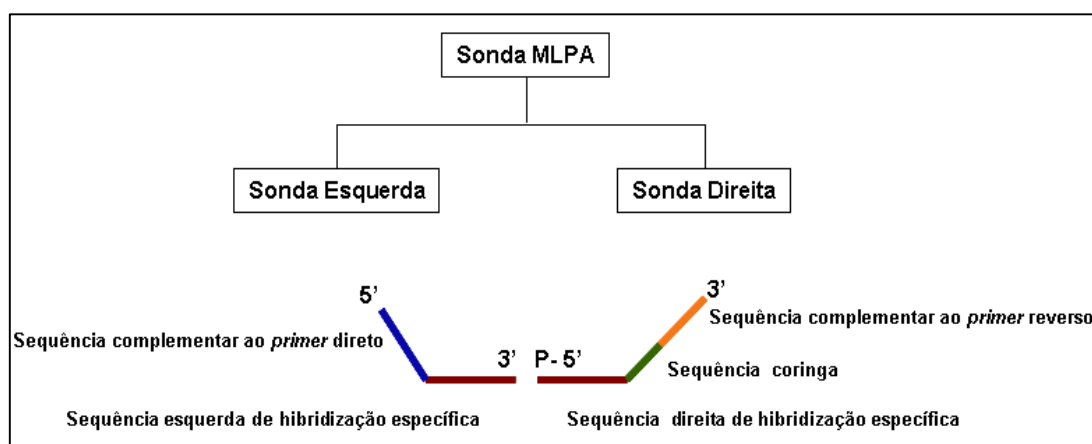


Figura 5. Figura 5 – Representação esquemática das sondas utilizadas no ensaio de MLPA. Adaptado de Schouten e colaboradores.⁽⁵⁴⁾

As duas sondas, quando submetidas à temperatura de anelamento, hidridizam-se a sequências complementares ao DNA-alvo. Em seguida, as sondas são unidas por uma enzima ligase (fase de ligação), formando um fragmento único. Após a fase de ligação, os fragmentos são amplificados por PCR, com a utilização de *primers* universais. Por fim, os produtos amplificados são separados por eletroforese capilar e podem ser analisados frente aos produtos de amplificação dos controles sem alteração, com auxílio de software específico para MLPA (*Coffalyser*). O número relativo de cópias de cada sequência alvo pode ser obtido por meio dos dados de área e altura de pico de cada produto amplificado nos testes em relação aos controles, permitindo desta forma, a identificação de deleções e/ou duplicações.⁽⁵⁶⁾

1.5 Estudos sobre as alfa- e beta-talassemias no Brasil

Diferentes estudos descreveram a frequência das talassemias no Brasil, embora poucos deles tenham empregado métodos moleculares. Alcoforado e colaboradores (2012), investigaram a alfa-talassemia em 713 adultos não aparentados do Rio Grande do Norte, com idade entre 18 e 59 anos, por meio de reação em cadeia de polimerase (PCR), e observaram que 80 indivíduos (11,2%) apresentavam a deleção $-\alpha^{3,7}$. Os 80 indivíduos diagnosticados com a deleção causadora de alfa-talassemia também apresentaram microcitose no hemograma.⁽⁵⁷⁾ Silva-Filho e colaboradores (2005), utilizaram a técnica de PCR para pesquisar a alfa-talassemia em 2.190 amostras de trabalhadores de 18 a 76 anos, do Rio de Janeiro, e encontraram 16 trabalhadores com a deleção $-\alpha^{3,7}$ (0,7%), sendo que 4 casos possuíam interação com o traço falciforme. A deleção $-\alpha^{4,2}$ não foi observada em nenhuma amostra.⁽⁵⁸⁾ Adorno e colaboradores (2005), empregaram a técnica de PCR para pesquisar as deleções $-\alpha^{3,7}$ e $-\alpha^{4,2}$ causadoras da alfa-talassemia em 590 recém-nascidos da Bahia, identificando 114 casos (22,2%) com a deleção $-\alpha^{3,7}$. Nenhum caso da deleção $-\alpha^{4,2}$ foi observado naquele estudo.⁽⁵⁹⁾

No Rio Grande do Sul, Wagner e colaboradores (2010), analisaram 101 indivíduos não aparentados com anemia microcítica. As amostras foram submetidas a uma reação de PCR *multiplex* para investigar as principais deleções causadoras da alfa-talassemia ($-\alpha^{3,7}$, $-\alpha^{4,2}$, $-\alpha^{20,5}$, $-\text{SEA}$ e $-\text{MED}$), e a deleção $-\alpha^{3,7}$ foi observada em 32 amostras, correspondendo a uma frequência de 31,7%.⁽⁶⁰⁾ Ao investigar a alfa-talassemia em 47 doadores de sangue afrodescendentes na cidade de Campinas, estado de São Paulo, Sonati e colaboradores (1991), detectaram a deleção $-\alpha^{3,7}$ em heterozigose em 21,3% das amostras, e 2,1% em homozigose.⁽⁶¹⁾

Borges e colaboradores, avaliaram 339 pacientes com idade superior a 14 anos, do Estado de São Paulo, com associação de microcitose e hipocromia e ausência de anemia. Os indivíduos foram submetidos à análise molecular para pesquisa de formas delecionais e não delecionais causadoras de alfa-talassemia ($-\alpha^{3,7}$, $-\alpha^{4,2}$, $-\text{MED}$, $-(\alpha)^{20,5}$, α^{HphI} , α^{NcoI} , $\alpha\alpha^{\text{NcoI}}$ e α^{TSAUDI}). Para detecção das formas delecionais, utilizou-se PCR *multiplex*; para as formas não delecionais, foram utilizadas enzimas de restrição (HphI and NcoI), e *nested* PCR para a forma α^{TSAUDI} . Verificou-se que 169 pacientes (49,9%) apresentaram alfa-talassemia, sendo 145 (42,8%) heterozigotos para a deleção $-\alpha^{3,7}$, 18 (5,3%) homozigotos para a deleção $-\alpha^{3,7}$, 5 (1,5%) apresentaram talassemia não delecional, α^{HphI} , e 1 indivíduo foi detectado como portador da

deleção $-^{MED}$. As formas não delecionais de alfa-talassemia são causadas por mutações de ponto, pequenas deleções (muito pouco frequentes), ou ainda por deleções fora do *cluster* alfa, onde os genes alfas permanecem intactos, porém sem expressão. ⁽⁶²⁾

Em relação às beta-talassemias, os estudos empregando métodos moleculares para diagnóstico também são relativamente escassos no Brasil. Em estudo recente, realizado na cidade de Franca, SP, Gomes e colaboradores (2017), determinaram a frequência das mutações CD39, IVS1-1, IVS1-6 e IVS1-110 em 25 indivíduos beta-talassêmicos por meio da reação de PCR alelo específica (PCR-AE). A mutação CD39 foi encontrada em 44% dos indivíduos, seguida por IVS1-6 (36%) e IVS1-110 (16%). Um paciente (4%) não apresentou nenhuma das mutações.⁽⁶³⁾ Noutro estudo realizado em Fortaleza, Ceará, região nordeste do Brasil, Rocha e colaboradores (2010), pesquisaram as mutações IVS-I-1, IVS-I-6 e CD 39 em 14 pacientes portadores de beta-talassemia. O método molecular empregado foi também a PCR-AE, e a distribuição das mutações identificadas foi: IVS-I-1 (14,3%), IVS-I-6 (35,7%) e CD 39 (21,4%). Os demais talassêmicos (28,6%) não apresentaram nenhuma das mutações estudadas. ⁽⁶⁴⁾

Em Natal, Rio Grande do Norte, Silveira (2010), avaliou 48 indivíduos com beta-talassemia (35 heterozigotos, 4 homozigotos e 9 com interação HbS/beta-talassemia). A caracterização molecular foi realizada por PCR e análise de restrição de fragmentos polimórficos (RFLP) mediante digestão com enzimas de restrição específicas para as mutações IVS-I-1, IVS-I-6 e CD39. Dentre os 35 heterozigotos, 13 (37,1%) apresentaram a mutação IVS-I-6, 15 (42,9%) a IVS-I-1 e 7 (20%) eram portadores de outras mutações não identificadas. Os quatro pacientes homozigotos apresentaram a mutação IVS-I-6, enquanto 6 (66,7%) dos indivíduos com HbS/beta-talassemia tinham a mutação IVS-I-1. A mutação CD39 não foi detectada em nenhum dos pacientes investigados.⁽⁶⁵⁾

O diagnóstico das talassemias é realizado por meio da integração de dados clínicos e hematológicos. A realização do hemograma é imprescindível, e frequentemente são encontradas alterações quantitativas e qualitativas. Normalmente há microcitose e hipocromia (diminuição da hemoglobina corpuscular média - HCM), não raro acompanhadas pela presença de hemácias em alvo na avaliação do esfregaço de sangue periférico. Os testes laboratoriais podem incluir diversas técnicas, sendo que as mais utilizadas atualmente envolvem a dosagem de

hemoglobina por cromatografia líquida de alta definição (HPLC), eletroforese por capilaridade e focalização isoeletrica. Esses testes podem ser utilizados isoladamente ou em combinação para identificar indivíduos portadores de talassemia.⁽⁶⁶⁾ O resultado esperado de um perfil de hemoglobinas em um indivíduo considerado normal, e com idade superior a 2 anos, é de: Hb A, >95%; Hb A2, 2,0 a 3,5%; e Hb Fetal, 0,0 a 2,0%.⁽⁶⁷⁾

Nas talassemias do tipo beta, além da microcitose presente no hemograma, observa-se elevação na dosagem de Hb A2 nos testes laboratoriais, com níveis acima de 3,5% do total de hemoglobinas, e concomitante diminuição da Hb A.⁽⁶⁸⁾

Indivíduos com alfa-talassemia podem apresentar variadas concentrações de hemoglobina no hemograma, desde níveis normais até intensa anemia; redução do VCM e HCM; contagem de eritrócitos normal ou aumentada, e dosagem de Hb A2 normal ou diminuída nos testes laboratoriais, a depender do número de genes alfa afetados.⁽³⁹⁾ Porém, o resultado normal destes testes não exclui o diagnóstico de alfa-talassemia, uma vez que nas deleções de um ou dois dos quatro genes alfa, não há necessariamente alteração quantitativa da concentração de Hb e da Hb A2, sendo a microcitose o único achado laboratorial nesses pacientes. Vários autores apontam dificuldades no diagnóstico laboratorial desses casos, que geralmente são diagnosticados corretamente apenas por meio de métodos moleculares.⁽⁶⁹⁾ O subdiagnóstico desta condição tem implicações diretas no aconselhamento genético e no tratamento destes pacientes, que em alguns casos podem ser induzidos à reposição de ferro indevida. O diagnóstico molecular da alfa-talassemia pode, portanto, evitar tratamentos desnecessários nos pacientes com microcitose sem causa prévia definida.⁽⁷⁰⁾

A microcitose é um achado muito comum na prática clínica e suas principais causas são: anemia ferropriva, beta talassemia, anemia da doença crônica e anemia sideroblástica.⁽⁷¹⁾ No entanto, quando essas causas são excluídas na investigação clínico-laboratorial, o diagnóstico da microcitose pode se tornar bastante desafiador. Chamou-nos a atenção, na rotina laboratorial do setor de Hematologia do Laboratório Central do Grupo Fleury, localizado na região sul da cidade de São Paulo, o elevado número de casos com microcitose no hemograma, concentração de Hb A2 e perfil de ferritina normais. Essa observação sugere que os métodos de triagem habitualmente empregados no diagnóstico das alfa-talassemias na prática clínica (eletroforese capilar associada a análise do hemograma) podem não estar refletindo sua real

ocorrência. Adicionalmente, também foi digna de nota em nossa rotina a grande quantidade de pacientes com elevação de Hb A2 e microcitose no hemograma, sugerindo o diagnóstico de beta-talassemia.

Dado que o Grupo Fleury dispõe de grande capilaridade, recebendo amostras representativas de sete diferentes regiões do país (Bahia, Distrito Federal, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo), gerando oportunidade única de explorar as características hematológicas e moleculares das alfa e beta-talassemias, o presente estudo é pioneiro no Brasil, tendo como objetivo investigar a ocorrência dessas doenças com o emprego de métodos moleculares em diferentes regiões do País.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral: Investigar por métodos moleculares a ocorrência da alfa-talassemia em pacientes com microcitose sem causas óbvias; identificar a presença de mutações causadoras de beta-talassemia nos pacientes com microcitose e elevação de Hb A2; e determinar a prevalência de ambas as condições em amostras provenientes de diferentes regiões do Brasil.

Objetivos Específicos:

- 1- Padronizar e validar a técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*) para análise de número de cópias do gene da alfa-globina, em associação à técnica de GAP-PCR multiplex para o diagnóstico molecular da alfa-talassemia;
- 2- Padronizar e validar a técnica de sequenciamento de DNA do gene da beta globina pelo método de Sanger para identificação de mutações associadas à beta-talassemia.
- 3- Correlacionar os achados moleculares (deleções e mutações), com o perfil hematológico da série vermelha (GV, HT, HB, VCM, RDW, Índice de Green e King) e de hemoglobinas (Hb A2 e Hb F) das alfa- e beta-talassemias;

3 PACIENTES E MÉTODOS

Trata-se de estudo prospectivo, com 500 amostras selecionadas no período de 15 de fevereiro a 1 de junho de 2016, coletadas de maneira consecutiva, no setor de Hematologia do Laboratório Central do Grupo Fleury, localizado na região Sul da cidade de São Paulo, onde são recebidas amostras provenientes das sete diferentes regiões do Brasil assistidas pelo Grupo Fleury. Tais regiões compreendem as áreas metropolitanas das capitais dos estados da Bahia, Distrito Federal, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo. Embora o DF não seja um Estado da Federação, neste trabalho agruparemos o DF como um Estado para efeitos práticos.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP, via Plataforma Brasil (Anexo 1). Todas as amostras envolvidas neste estudo foram descaracterizadas e numeradas sequencialmente antes de serem submetidas aos testes moleculares, com intuito de preservar o anonimato dos pacientes.

Foram incluídas amostras consecutivas de indivíduos de ambos os sexos, com idade igual ou superior a 2 anos, que após realizarem os testes de hemograma e eletroforese de hemoglobinas, apresentaram quadro sugestivo de beta-talassemia, devido à presença de microcitose ($VCM < \text{do que valor de referência de acordo com sexo e idade}$) e dosagem de Hb A2 aumentada ($>3,5\%$), ou, quadro sugestivo de alfa-talassemia, devido à combinação de microcitose e dosagem de Hb A2 normal ($2,0\%$ a $3,5\%$) ou diminuída ($<2,0\%$), e dosagem de ferritina normal. Indivíduos com idade inferior a 2 anos não foram incluídos neste estudo.

Das 500 amostras coletadas, 208 foram classificadas como sugestivas de beta-talassemia e 292 como sugestivas de alfa-talassemia (Apêndices 1 e 2). Três técnicas moleculares foram empregadas para a caracterização dos casos. As técnicas de GAP-PCR e Amplificação de Múltiplas Sondas Dependente de Ligação (*Multiplex Ligation - Dependent Probe Amplification*, MLPA) foram utilizadas para os casos com suspeita de alfa-talassemia, e o sequenciamento de DNA pelo método de Sanger foi utilizado para os casos sugestivos de beta-talassemia.

3.1 Hemograma e eletroforese de hemoglobinas

Os dados hematológicos de todas as amostras envolvidas neste estudo foram obtidos através dos analisadores automáticos Sysmex® XE-5000™ e XE-2100™

(Sysmex – Roche). A eletroforese de hemoglobinas foi realizada por método capilar, no equipamento Capillarys 2 Flex Piercing® (Sebia). Ambos os testes foram realizados na rotina laboratorial do setor de hematologia do Grupo Fleury, na sede Jabaquara I, na cidade de São Paulo, SP. As operações técnicas seguem rígidos processos de validação de testes e controle de qualidade, certificados pelos órgãos de qualidade competentes.

3.2 Dosagem de ferritina

A determinação quantitativa de ferritina no soro foi feita através de método Eletroquimioluminométrico por técnica automatizada, utilizando-se o equipamento Modular E 170® (Roche), de acordo com as instruções do fabricante, sendo os resultados expressos em µg/L.

3.3 Extração de DNA

Para a realização das análises moleculares, o DNA genômico de cada amostra de sangue periférico foi extraído de forma automatizada, de acordo com as instruções do fabricante, utilizando o kit QIAamp® DNA Blood Mini Kit, no equipamento QIAcube® (QIAGEN). Todas as amostras foram extraídas em duplicata, para garantir repetição caso houvesse necessidade. Após a extração, a concentração e o grau de pureza do DNA foram dosados por espectrofotômetro no equipamento NanoDrop™ – (Thermo Scientific™). O DNA extraído de todas as amostras foi armazenado a -70°C até a realização dos experimentos.

3.4 Validação do método Gap-PCR Multiplex

Para a identificação das principais deleções causadoras da alfa-talassemia foi realizada a técnica de Gap-PCR multiplex, descrita por Chong e colaboradores (2000).⁽⁷²⁾ Esse método molecular permite a identificação das deleções mais comuns da alfa-talassemia ($-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$, $--SEA$, $--FIL$, $--THAI$, $-(\alpha)^{20.5}$ e $--MED$) em uma reação de tubo único.

No Brasil, as deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$ são mais comumente observadas, sendo a deleção $-\alpha^{3.7}$ a mais prevalente.^(73, 74) Devido a este fato, no presente estudo utilizamos a técnica de Gap-PCR Multiplex de forma adaptada para detectar somente essas duas alterações.

Os ensaios foram realizados utilizando o QIAGEN® Multiplex PCR kit (QIAGEN), e os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos sintetizados pela empresa Exxtend (Tabela 1). Para assegurar a especificidade e sensibilidade da técnica, utilizou-se um controle positivo para a deleção mais frequente (amostra enviada para laboratório de referência Mayo, $-\alpha^{3.7}$), e como controle de funcionamento de reação utilizou-se à amplificação do gene *LIS*.

Tabela 1. Primers utilizados para detecção das deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$ da alfa-talassemia

Primer	Sequência 5'-3'	Concentração	Tamanho do fragmento
LIS1-F	GTCGTCAGTGGCAGCGTAGATC	1,0 μ M	2500 pb
LIS1-R	GATTCCAGGTTGTAGACGGACTG	1,0 μ M	
3.7-F	CCCCTCGCCAAGTCCACCC	0,2 μ M	2022 pb
3.7-R	AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG	0,2 μ M	
$\alpha 2$ -R	AGACCAGGAAGGGCCGGTG	0,2 μ M	1800 pb
4.2-F	GGTTTACCCATGTGGTGCCTC	0,5 μ M	1628 pb
4.2-R	CCCGTTGGATCTTCTCATTCCC	0,5 μ M	

Fonte: Adaptado de Chong e colaboradores. ⁽⁷²⁾

Para cada ensaio utilizou-se 12,5 μ L de Master mix, e 5 μ L de Q-solution 1X, adicionados a 100 ng de DNA genômico, em um volume final de 25 μ L. A placa de reação foi conduzida ao termociclador Veriti™ (ThermoFisher Scientific) e os ciclos da reação em cadeia de polimerase (PCR) foram realizados da seguinte forma: 96°C por 15 minutos, 30 ciclos de [98°C por 45 segundos, 90 segundos a 62°C, 135 segundos a 72°C], seguido de 5 minutos a 72°C para completa extensão.

Para visualizar os fragmentos amplificados, foram aplicados 10 μ L do produto de PCR em um gel de agarose a 1% em tampão TBE (Tris/Borato/EDTA).

A corrida de eletroforese foi realizada a 125 volts, em cuba contendo tampão TBE 1X durante 4 horas. Foram adicionados ao gel de agarose 4 μ L de padrão de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen™) para comparação dos fragmentos amplificados. Os fragmentos de DNA foram visualizados em fotodocumentador de luz ultravioleta (L-PIX Chemi Molecular Imaging, Locus®).

3.5 Validação do método MLPA (Multiplex Ligation -Dependent Probe Amplification)

Para a validação da técnica de MLPA® foi utilizado o kit SALSA MLPA P140 HBA, da empresa MRC-Holland. Esse kit contém 45 sondas, sendo 34 específicas para o *cluster HBA* e regiões flangeadoras no cromossomo 16, e 11 sondas de controle de qualidade interno. O kit de MLPA contempla também outros dois parâmetros de qualidade de reação, fornecidos pelos fragmentos Q e D. O primeiro indica se a quantidade de DNA empregada no ensaio foi suficiente, e o segundo se houve a completa desnaturação do DNA.

As características de cada sonda, como tamanho e região cromossômica estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. SALSA P140 HBA

Tamanho (pb)	Sonda SALSA MLPA	Posição no cromossomo	
		Referência	Cluster HBA
64-70-76-82	Fragmentos controle Q: visíveis somente quando há menos do que 100 ng de DNA na reação.		
88-92-96	Fragmentos controle DD: fragmentos menores que 88 ou 96 pb indicam desnaturação incompleta.		
100	Fragmento específico para o cromossomo X.		
105	Fragmento específico para o cromossomo Y.		
130	Sonda de controle interno	5q31	
136	Sonda <i>HBA2</i>		Hb Constant Spring
142	Sonda de controle interno	8p23	
147	Sonda região <i>HBA</i>		0.9 kb antes de <i>HBA2</i>
154	Sonda região <i>HBA</i>		0.1 kb depois de <i>HBA1</i>
160	Sonda <i>HBA2</i>		<i>HBA2</i> intron 2
165	Sonda <i>HBA1</i>		<i>HBA1</i> intron 2
172	Sonda <i>HBA1</i> & <i>HBA2</i>		<i>HBA1</i> + <i>HBA2</i> éxon 3
178	Sonda HS-40		HS-40
184	Sonda região <i>HBA</i>		entre <i>HBAP2</i> & <i>HBAP1</i>
190	Sonda região <i>HBA</i>		2.5 kb antes de <i>HBA1</i>
196	Sonda de controle interno	10q26	
202	Sonda região <i>HBA</i>		2.0 kb antes de <i>HBA1</i>
208	Sonda de controle interno	12p13	
214	Sonda <i>HBA1</i> & <i>HBA2</i>		<i>HBA1</i> + <i>HBA2</i> éxon 1
220	Sonda <i>HBA1</i> & <i>HBA3</i>		<i>HBA1</i> + <i>HBA2</i> éxon 2
226	Sonda região <i>HBA</i>		0.6 kb antes de <i>HBA1</i>
238	Sonda de controle interno	1q41	
244	Sonda <i>HBA2</i>		<i>HBA2</i> intron 2
250	Sonda <i>HBA1</i>		<i>HBA1</i> intron 2
256	Sonda região <i>HBA</i>		1.5 kb antes de <i>HBA1</i>
262	Sonda <i>DECR2</i>		região centromérica <i>HBA</i>
269	Sonda de controle interno	5p15	

277	Sonda <i>LUC7L</i>		região centromérica <i>HBA</i>
283	Sonda região <i>HBA</i>		0.4 kb depois de <i>HBA1</i>
292	Sonda região <i>HBA</i>		entre <i>HBZ</i> & <i>HBZP1</i>
300	Sonda de controle interno	13q14	
310	Sonda região <i>HBA</i>		2.3 kb depois de <i>HBA1</i>
328	Sonda região <i>HBA</i>		0.6 kb antes de <i>HBA2</i>
337	Sonda região <i>HBA</i>		0.9 kb antes de <i>HBA1</i>
346	Sonda região <i>HBA</i>		3.5 kb antes de <i>HBZ</i>
355	Sonda de controle interno	11q22	
364	Sonda região <i>HBA</i>		9.2 kb antes de <i>HBZ</i>
373	Sonda região <i>HBA</i>		2.5 kb antes de <i>HBA2</i>
382	Sonda HS-40		HS-40
391	Sonda região <i>HBA</i>		3.0 kb antes de <i>HBA2</i>
400	Sonda <i>HBQ1</i>		<i>HBQ1</i> éxon 3
409	Sonda de controle interno	3q29	
418	Probe <i>AXIN1</i>		região centromérica <i>HBA</i>
436	Sonda região <i>HBA</i>		0.2 kb antes de <i>HBZ</i>
445	Sonda <i>ITFG3</i>		região centromérica <i>HBA</i>
454	Sonda de controle interno	15q26	
463	Sonda <i>POLR3K</i>		região telomérica <i>HBA</i>
472	Sonda <i>RGS11</i>		região centromérica <i>HBA</i>
481	Sonda de controle interno	2q33	

Fonte: MRC Holland.

O protocolo utilizado para validação desta técnica envolveu 5 etapas e encontra-se em conformidade ao descrito pelo fabricante MRC-Holland. O protocolo está detalhado a seguir.

3.5.1 Preparo das amostras

Utilizamos um volume de 5 µL de amostra contendo 150 ng de DNA genômico diluído em ATE 1X (kit QIAamp® DNA Blood Mini Kit, QIAGEN). As amostras foram pipetadas em placas de reação de 96 poços (USA® Scientific). Foram empregadas 4 amostras controle, provenientes de indivíduos não portadores de deleções causadoras de alfa-talassemia em cada placa de experimento.

3.5.2 Reação de desnaturação do DNA e hidridização com o mix de sondas

Para desnaturação do DNA a placa de reação foi levada ao termociclador Veriti™ - ThermoFisher Scientific, na temperatura de 98°C por 5 minutos. Em seguida, com as amostras a 25°C, foi acrescentado o mix de hibridação contendo 1,5 µL de

SALSA Probe-mix (Figura 6) e 1,5 µL de MLPA buffer. Essa mistura foi mantida a 95°C por 1 minuto e incubada a 60°C durante 16 horas.

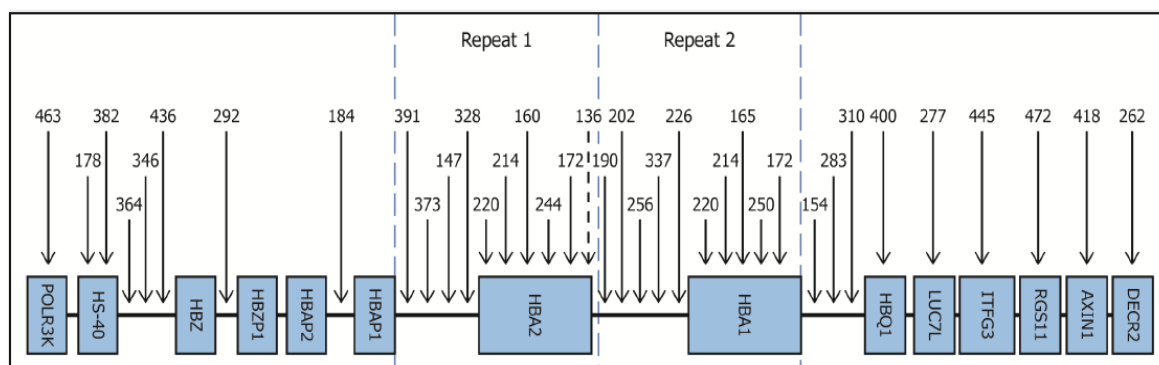


Figura 6. Representação esquemática da localização das sondas no *cluster* e genes HBA.
Fonte: MRC Holland.

3.5.3 Reação de ligação

A temperatura do termociclador foi reduzida a 54°C e, em seguida, 32 µL de Mix Ligase-65 foram acrescentados a cada amostra, com posterior homogeneização, evitando a formação de bolhas. Este mix foi obtido com a mistura de 25 µL de água (H₂O), 3 µL de Ligase-65 buffer A 3 µL de Ligase-65 buffer B, e 1 µL da enzima Ligase-65. Em seguida, a placa de reação permaneceu incubada a 54°C por 15 minutos, e posteriormente foi aquecida a 98°C por 5 minutos.

3.5.4 Reação de PCR

O mix de PCR foi preparado em um eppendorf âmbar, adicionando-se 7,5 µL de água (H₂O), 2,0 µL de Salsa PCR buffer (contendo *primers* marcados com a fluorescência FAM) e 0,5 µL de polimerase. Posteriormente, 10 µL desse mix foram adicionados a cada amostra, e a reação de amplificação ocorreu segundo o programa descrito na Figura 7.

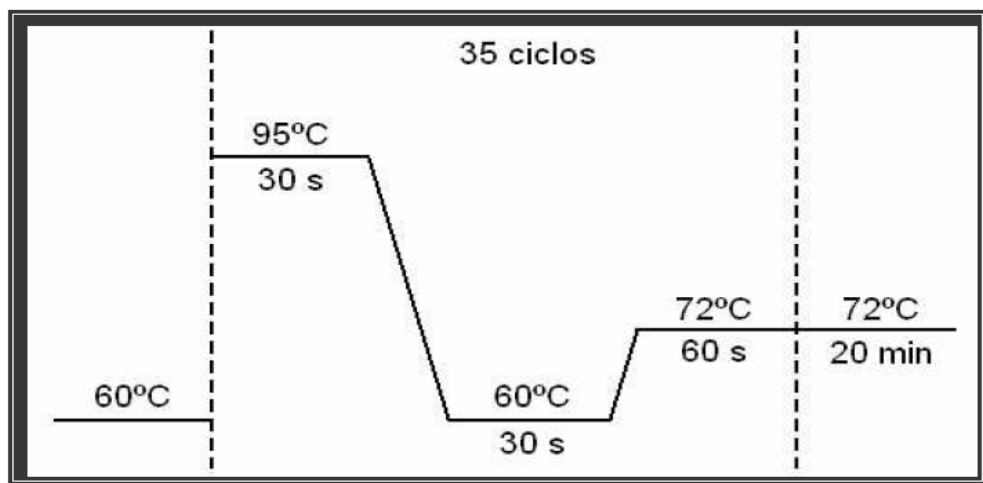


Figura 7. Ciclos de amplificação dos fragmentos de MLPA
 Fonte: MRC Holland, website do MLPA ([http:// www.mlpa.com](http://www.mlpa.com)).

3.5.5 Separação dos produtos amplificados no sequenciador

Uma nova placa de reação de 96 poços contendo 9,0 μL de Formamida Hi-Di™ (ThermoFisher Scientific) e 0,2 μL de LIZ 500 (GeneScan™ -500 LIZ®) foi preparada. Em seguida, 0,7 μL do produto de amplificação de cada amostra foi acrescentado. A mistura foi incubada a 86°C por 3 minutos para desnaturação, seguida de 2 minutos a 4°C. A separação dos fragmentos foi realizada por eletroforese capilar no sequenciador ABI 3130 XL -Applied Biosystems®. As sequências obtidas foram posteriormente analisadas com o auxílio do *software* Coffalyser.NET -MRC Holland.

3.6 Validação do sequenciamento de DNA - método de Sanger

Para pesquisar as principais mutações causadoras de beta-talassemia, foi realizado o sequenciamento de DNA do gene da beta globina humana (*HBB*) pelo método de Sanger. A técnica foi composta de 4 etapas: amplificação das regiões alvo através do ensaio de PCR; reação de sequenciamento; reação de precipitação e; eletroforese capilar em sequenciador automatizado. Foram utilizados o kit BigDye® Direct Cycle Sequencing (ThermoFisher Scientific) e os *primers* específicos para amplificação dos 3 *éxons*, do ponto de junção *éxon-intron* e uma pequena parte dos 2 *íntrons* pertencentes a esse gene. Os *primers* foram sintetizados pela empresa Exxtend (Tabela 3). A sequência M13, *primer* universal, foi adicionada à extremidade 5' para otimizar a posterior reação de sequenciamento.

Tabela 3. Primers utilizados para amplificação das regiões alvo no gene *HBB*

Primer	Sequência
B1- F	5'- TGTAAAACGACGGCCAGT TTGGGCATAAAAGTCAGGGCA - 3'
B1- R	5'- CAAAACAGCTATGACC GTGCCTATCAGAAACCCAAGAGTC - 3'
B2- F	5'- TGTAAAACGACGGCCAGT GACTCTTGGGTTTCTGATAGGCAC - 3'
B2- R	5'- CAGGAAACAGCTATGACC TCATTCGTCTGTTTCCCATTCTAA - 3'
B3- F	5'- TGTAAAACGACGGCCAGT CATTCTGCTTTTATTTTATGGTTGGG - 3'
B3- R	5'- CAGGAAACAGCTATGACC CTGACCTCCCACATTCCCTTTTT - 3'

Nota: A sequência M13 (*forward e reverse*) dos *primers* está destacada em vermelho.

Fonte: Adaptado de Reddy e colaboradores. ⁽⁷⁵⁾

3.6.1 Reação de PCR

A reação de PCR foi realizada em 3 tubos distintos, com cada tubo recebendo seus respectivos pares de *primers* para amplificação das 3 regiões alvo (Figura 8), com a seguinte composição: 10 µL de Master Mix Big Dye® para PCR 1X, 4,8 µL de água (H₂O) e 1,6 µL de *primers* na concentração de 0,8 µM. Posteriormente, o conteúdo dos 3 diferentes tubos foi transferido para uma placa de reação de 96 poços (USA® Scientific), onde foram adicionados 2 µL de DNA (4ng/µL) de cada amostra, totalizando um volume final de 20 µL.

As condições de ciclagem foram 10 minutos a 95°C, 35 ciclos de [96°C por 3 segundos, 15 segundos a 62°C, 30 segundos a 68°C], seguido de 2 minutos a 72°C.

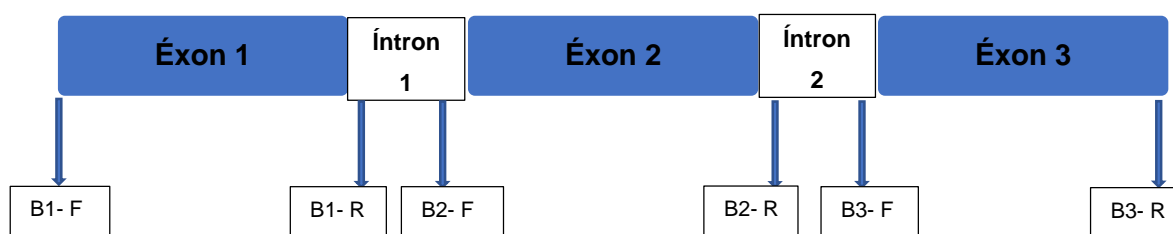


Figura 8. Representação esquemática da localização dos *primers* no gene *HBB* para caracterização das mutações causadoras de beta-talassemia.

Os resultados de amplificação foram verificados por meio de eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE. A corrida foi padronizada da seguinte forma: 2 µL de produto de PCR e 4 µL de padrão de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen®) por 50 minutos em 100 volts. Os fragmentos de DNA foram visualizados em fotodocumentador de luz ultravioleta (L-PIX Chemi Molecular Imaging, Locus®).

3.6.2 Reação de sequenciamento

Após a visualização dos produtos amplificados em gel de agarose, as amostras foram submetidas a reação de sequenciamento com a seguinte composição: 1,0 µL de água (H₂O), 1,0 µL de Master Mix Big Dye para sequenciamento 1X e 1,0 µL de primers, ambos do kit Big Dye® Direct Cycle Sequencing (ThermoFisher Scientific). O *mix* de reagentes foi transferido a uma placa de reação de 96 poços (USA® Scientific), onde adicionou-se 7 µL do produto de PCR de cada amostra. Posteriormente a placa de reação foi conduzida ao termociclador (Veriti™ - ThermoFisher Scientific), no qual foi realizado o seguinte ciclo: 37°C por 15 minutos, 80°C por 2 minutos, 96°C por 1 minuto, 25 ciclos de [96°C por 10 segundos, 5 segundos a 50°C, 75 segundos a 60°C], seguidos de 2 minutos a 4°C.

3.6.3 Reação de precipitação

A reação de precipitação das amostras foi realizada com adição de 45 µL de SAM, e 10 µL de X-terminator por amostra, ambos do kit BigDye XTerminator™ Purification Kit (ThermoFisher Scientific).

3.6.4 Eletroforese capilar

A eletroforese capilar foi realizada em sequenciador automático, ABI 3130 XL - Applied Biosystems®. Os resultados obtidos foram posteriormente analisados com o *software* CLC-Genomics Workbench, versão 8.0.1 - QIAGEN®, utilizando-se como referência a sequência do gene *HBB* depositada em banco de dados (NCBI_U01317) para identificação de variações e mutações causadoras de beta-talassemia, em associação com a base de dados mundial de hemoglobinopatias, HbVar, disponível em <http://globin.cse.psu.edu/hbvar/menu.html>.

3.7 Análise estatística

As variáveis foram descritas por meio de estatísticas de posição (média, mediana) e escala (desvio padrão, intervalo interquartil). As variáveis categóricas foram apresentadas por frequências absolutas e relativas. Inicialmente apresentou-se o perfil dos pacientes nas duas coortes (pacientes sugestivos de alfa ou beta-talassemias). Em seguida realizou-se comparações em cada coorte dos pacientes com marcadores positivos ou negativos para cada uma das condições.

Para variáveis categóricas foram apresentados testes exatos de Fisher nas comparações, e para as variáveis contínuas, teste t-student ou F da ANOVA (quando comparados 2 grupos ou 3 ou mais, respectivamente) se a suposição de normalidade dos dados estivesse satisfeita. Caso contrário compararam-se os grupos utilizando testes não paramétricos: *Mann-Whitney* comparando 2 grupos, ou *Kruskal-Wallis* para comparação entre 3 ou mais grupos.

4 RESULTADOS

No período determinado de 15 de fevereiro a 1 de junho de 2016, foram analisadas de forma consecutiva, 4815 amostras de indivíduos do setor de Hematologia do Laboratório Central do Grupo Fleury. As amostras recebidas eram provenientes dos estados da Bahia, Distrito Federal, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo. Após análise de 4815 casos, excluiu-se do estudo 314 amostras devido às mesmas pertencerem a indivíduos com idade inferior a 2 anos. Nas 4501 amostras restantes, aplicaram-se os critérios de inclusão para selecionar os casos sugestivos de alfa e beta-talassemias (Figura 9). Foram elegidas 500 amostras, sendo 208 sugestivas de beta-talassemia (Grupo 1), e 292 sugestivas de alfa-talassemia (Grupo 2).

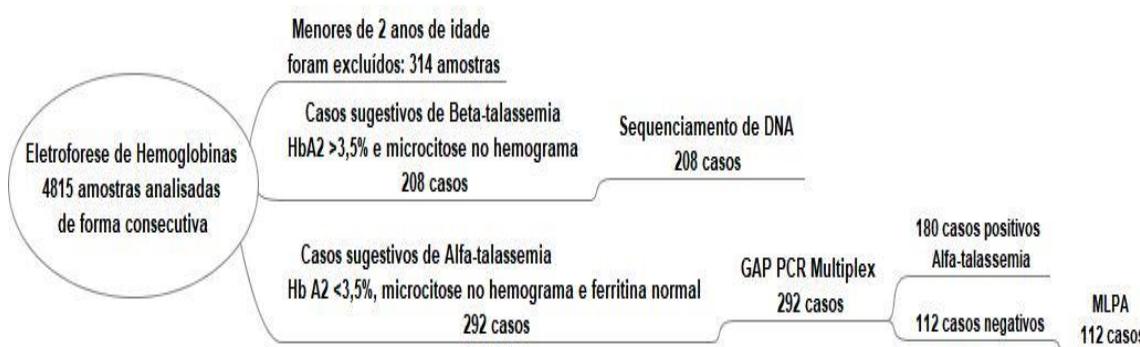


Figura 9. Delineamento do estudo.

A discriminação de amostras por estado, seguidos da suspeita e confirmação de talassemia alfa ou beta, bem como a “prevalência” (ocorrência de casos positivos de talassemia na população avaliada em cada estado), está descrita na Tabela 4. Para confirmação da alfa-talassemia utilizaram-se as técnicas de GAP-PCR Multiplex e MLPA. Já nos casos com suspeita de beta-talassemia, o sequenciamento de Sanger foi empregado.

Durante o período do estudo (15 de fevereiro a 1 de junho de 2016) das 4501 amostras analisadas, apenas 46 pertenciam ao Distrito Federal, entretanto, nenhuma destas apresentou resultado sugestivo de alfa ou beta-talassemias. Em relação às demais áreas metropolitanas das capitais assistidas pelo Grupo Fleury (Bahia, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo), a quantidade de amostras provenientes de cada uma é compatível com a quantidade de clientes

atendidos em nosso serviço nestas regiões. Os estados do Rio de Janeiro e São Paulo destacam-se pelo maior volume de amostras e, conseqüentemente pelo maior número de casos sugestivos de alfa ou beta-talassemias.

Tabela 4. Confirmação de talassemias alfa e beta e “prevalência” por Estado.

Talassemia	Estados	Total de Exames	Suspeita	Confirmação	Confirmação (%) [IC 95%]	"Prevalência" (%) [IC 95%]
Alfa-talassemia	DF	46	0	0	-	-
	BA	395	13	12	92,3 [62,1; 99,6]	3 [1,7; 5,4]
	PE	80	5	4	80 [29,9; 98,9]	5 [1,6; 13]
	PR	59	7	5	71,4 [30,3; 94,9]	8,5 [3,2; 19,4]
	RJ	810	79	61	77,2 [66,1; 85,6]	7,5 [5,9; 9,6]
	RS	221	16	8	50 [28; 72]	3,6 [1,7; 7,3]
	SP	2890	172	99	57,6 [49,8; 65]	3,4 [2,8; 4,2]
	TOTAL	4501	292	189	64,7 [58,9; 70,1]	4,2 [3,7; 4,9]
Beta-talassemia	DF	46	0	0	-	-
	BA	395	6	5	83,3 [36,5; 99,1]	1,3 [0,5; 3,1]
	PE	80	3	3	100 [31; 100]	3,8 [1; 11,3]
	PR	59	5	4	80 [29,9; 98,9]	6,8 [2,2; 17,3]
	RJ	810	25	24	96 [77,7; 99,8]	3 [1,9; 4,4]
	RS	221	19	18	94,7 [71,9; 99,7]	8,1 [5; 12,8]
	SP	2890	150	140	93,3 [87,8; 96,6]	4,8 [4,1; 5,7]
	TOTAL	4501	208	194	93,3 [88,7; 96,1]	4,4 [3,8; 5]

IC 95%: Intervalo de confiança de 95%.

Nota: O termo “prevalência” indica a ocorrência de positividade de talassemia alfa ou beta em cada Estado.

4.1 Grupo 1: Casos sugestivos de beta-talassemia

As 208 amostras denominadas sugestivas de beta-talassemia, foram previamente selecionadas devido à presença de microcitose no hemograma, em associação à dosagem de Hb A2 aumentada (>3,5%) no teste de eletroforese de Hb por metodologia capilar (Figura 10).

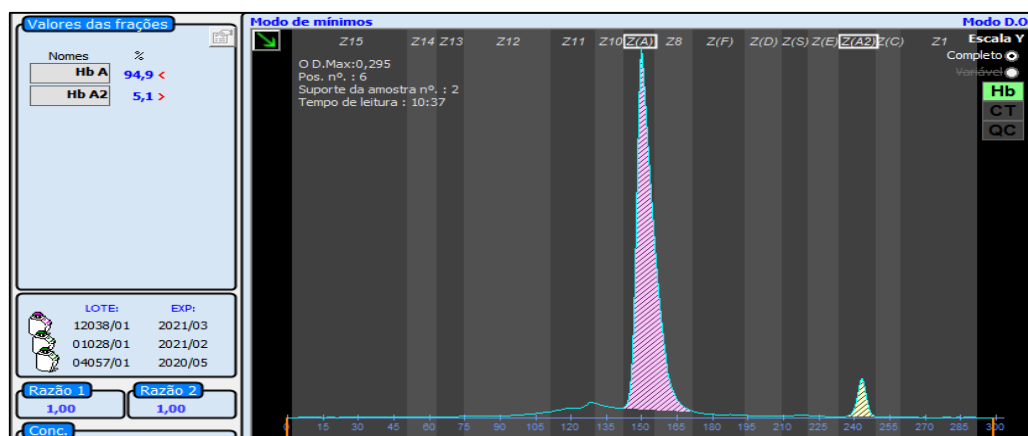


Figura 10. Eletroforese de hemoglobinas com aumento da fração de Hb A2 –pico menor (>3,5%). Equipamento Capillarys 2 Flex Piercing® (Sebia).

Todas as 208 amostras foram submetidas à reação de PCR para amplificação dos 3 éxons do gene *HBB* (Figura 11), e em seguida à reação de sequenciamento de DNA pelo método de Sanger.

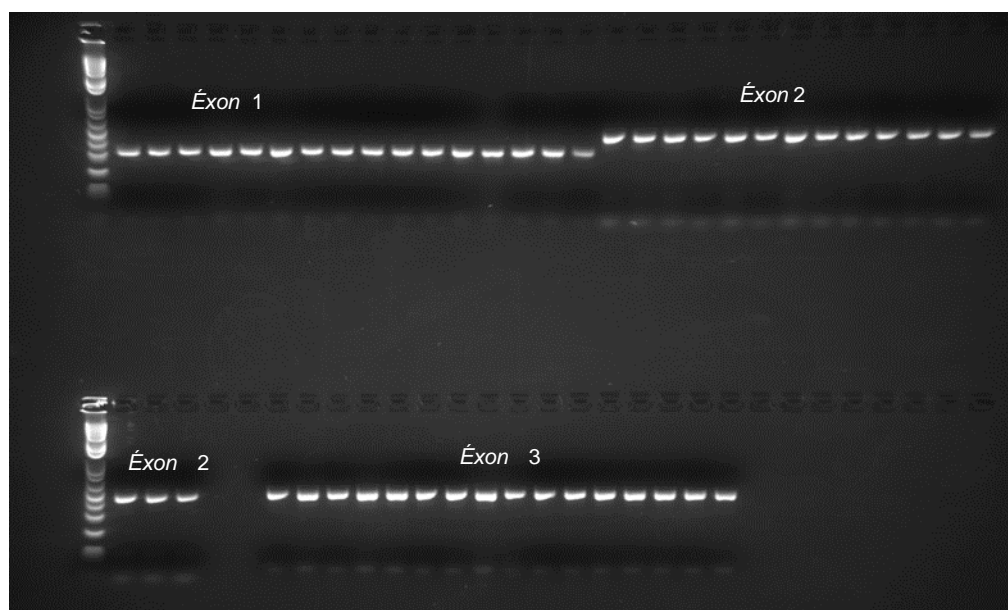


Figura 11. Produtos da amplificação dos 3 éxons do gene HBB. Reação de PCR do gene HBB com 16 amostras. Foram amplificadas as 3 regiões alvo de cada amostra. O tamanho dos produtos de amplificação dos éxons 1, 2 e 3, é de 269, 400 e 420 pares de bases, respectivamente.

Os resultados do sequenciamento de DNA do gene *HBB* para identificar as mutações causadoras de beta-talassemia, estão descritos na tabela 5. As análises do sequenciamento foram realizadas com auxílio do software CLC-Genomics

Workbench, versão 8.0.1 - QIAGEN®. Das 208 amostras analisadas, em 194 (que correspondem à 93,3% das amostras) foram identificados 15 tipos de mutação. A maioria dos pacientes apresentaram resultados positivos para as seguintes mutações em heterozigose: CD 39 (c.118 C>T) em 42,3% dos casos; seguido de 19,2% de IVS-I-6 (c.92+6 T>C), e outros 17,3% da mutação IVS-I-110 (c.93-21 G>A). As Figuras 12, 13 e 14, representam às mutações CD 39, IVS-I-6 e IVS-I-110, respectivamente.

Tabela 5. Resultados do sequenciamento de DNA do gene HBB

Resultado	Total (n=208)
CD 39 c. 118 C>T heterozigose	88/208 (42.3%)
Códon 11 -T c.36 del T heterozigose	1/208 (0.5%)
Códon 15 c.48 G>A heterozigose	3/208 (1.4%)
Códon 44 c.135 delC heterozigose	1/208 (0.5%)
Códon 47 c.143_144 ins A	1/208 (0.5%)
Códon 6 -A c.20 del A heterozigose	1/208 (0.5%)
Códon 8 -AA c.25_26 del AA heterozigose	1/208 (0.5%)
IVS-I-1 c.92+1 G>A heterozigose	11/208 (5.3%)
IVS-I-110 c.93-21 G>A heterozigose	36/208 (17.3%)
IVS-I-129 c.93 -2 A>G heterozigose	1/208 (0.5%)
IVS-I-2 c.92+2 T>C heterozigose	1/208 (0.5%)
IVS-I-5 c.92+5 G>A heterozigose	4/208 (1.9%)
IVS-I-6 c.92+6 T>C heterozigose	40/208 (19.2%)
IVS-II-1 c.315+1 G>A heterozigose	4/208 (1.9%)
*c.126_127 delCT heterozigose	1/208 (0.5%)
Negativo	14/208 (6,7%)

Nota: *Mutação não descrita no *HbVar*.

Uma das mutações identificadas em nosso estudo (amostra 266), não está descrita no banco de dados mundial de hemoglobinopatias, o *HbVar*, e por este motivo a mesma foi caracterizada neste estudo de acordo com sua posição no gene *HBB*, sendo denominada c.126_127 delCT, envolvendo os códons 41/42 (-CT), (Figura 15). Essa mutação corresponde a deleção de uma citosina (C) e uma timina (T) (manuscrito em andamento). Na base de dados *HbVar* há a descrição de outra deleção no mesmo códon (41/42), mas de quatro bases (CTTT), denominada c.126_129 delCTTT.

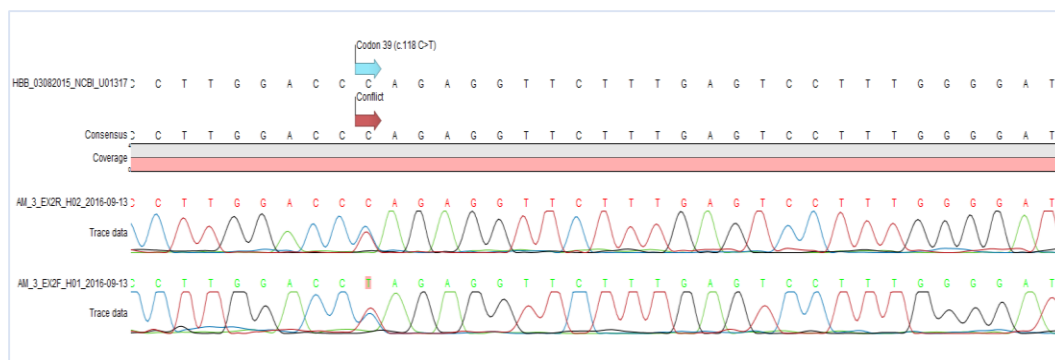


Figura 12. Perfil de eletroforese capilar do paciente 3, portador da mutação CD 39 (c.118 C>T) em heterozigose.

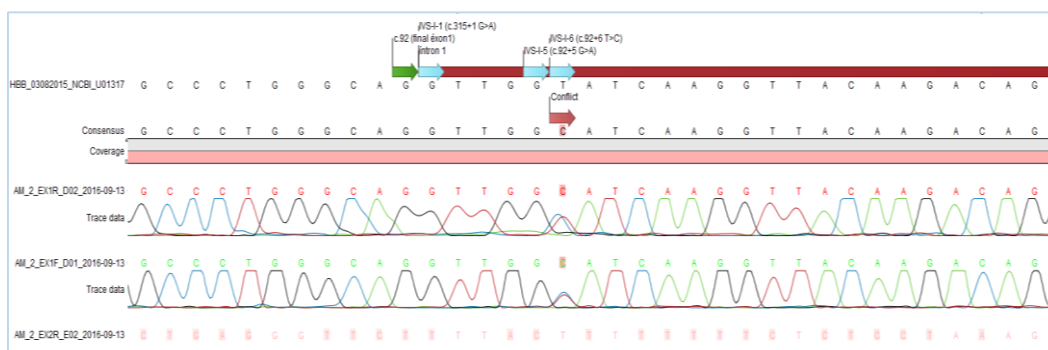


Figura 13. Perfil de eletroforese capilar do paciente 2, portador da mutação IVS-I-6 (c.92+6 T>C) em heterozigose.

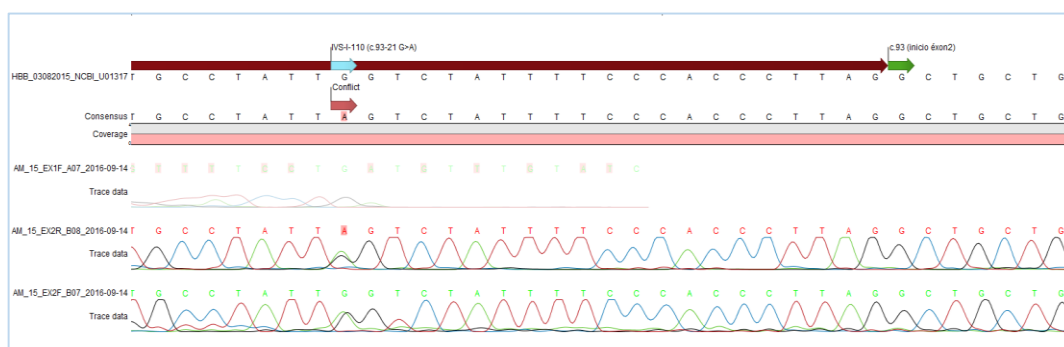


Figura 14. Perfil de eletroforese capilar do paciente 15, portador da mutação IVS-I-110 (c.93-21 G>A) em heterozigose.

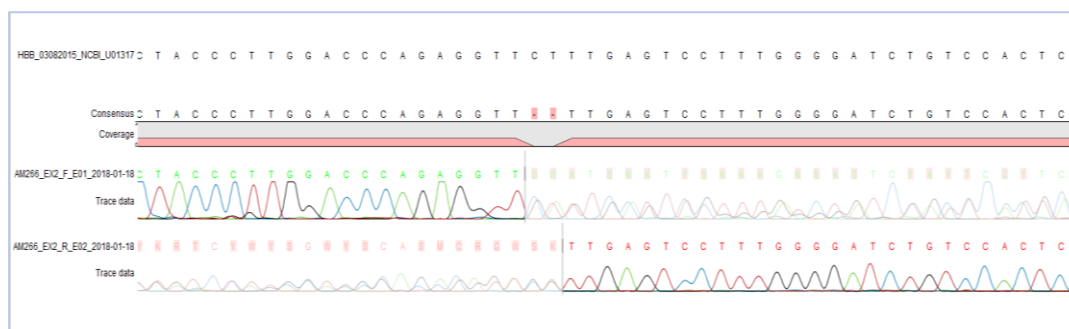


Figura 15. Perfil de eletroforese capilar do paciente 266, portador da mutação c.126_127 delCT em heterozigose. Essa mutação não está descrita no *HbVar*.

Os dados referentes à idade e sexo, e a dispersão de casos por estado, dos casos sugestivos de beta-talassemia, estão descritos na Tabela 6. As amostras oriundas do estado de SP, representaram 72,1% do total de amostras do grupo 1. Em relação ao sexo das amostras, 62,5% dos casos eram do sexo feminino. Confirmou-se o diagnóstico molecular de beta-talassemia em 93,3% dos pacientes.

Tabela 6. Descrição dos dados de idade, estado e sexo, dos casos sugestivos de beta-talassemia, segundo resultado do sequenciamento de DNA do gene HBB

Variáveis	Beta-talassemia			p ¹
	Negativas (n=14)	Positivas (n=194)	Total (n=208)	
Idade (anos); média ± dp	39,5 ± 16,6 (n=14)	34,1 ± 20,5 (n=194)	34,4 ± 20,3 (n=208)	0,333 ²
Estado				
BA	1/14 (7,1%)	5/194 (2,6%)	6/208 (2,9%)	0,466
PE	0/14 (0%)	3/194 (1,5%)	3/208 (1,4%)	
PR	1/14 (7,1%)	4/194 (2,1%)	5/208 (2,4%)	
RJ	1/14 (7,1%)	24/194 (12,4%)	25/208 (12%)	
RS	1/14 (7,1%)	18/194 (9,3%)	19/208 (9,1%)	
SP	10/14 (71,4%)	140/194 (72,2%)	150/208 (72,1%)	
Sexo				
Feminino	7/14 (50%)	123/194 (63,4%)	130/208 (62,5%)	0,394
Masculino	7/14 (50%)	71/194 (36,6%)	78/208 (37,5%)	

(1) Teste exato de Fisher

(2) Teste t-student

Os perfis hematológico e de hemoglobinas, dos pacientes com resultados positivos e negativos no sequenciamento de DNA do gene *HBB*, encontram-se descritos na Tabela 7. As dosagens de HT (hemograma), HB e VCM, nos pacientes positivos para mutações causadoras de beta-talassemia, foram mais baixas do que

as observadas nos pacientes negativos no sequenciamento de DNA ($p < 0,05$). Em relação aos outros parâmetros avaliados, não houve diferença significativa entre os grupos de pacientes positivos e negativos para o teste de detecção de mutações causadoras de beta-talassemia.

Tabela 7. Perfil hematológico e de hemoglobinas dos casos sugestivos de beta-talassemia, segundo resultado do sequenciamento de DNA.

Variáveis	Beta-talassemia			p ¹
	Negativas (n=14)	Positivas (n=194)	Total (n=208)	
Hb A₂ ; média ± dp	5,5 ± 0,5 (n=14)	5,1 ± 0,7 (n=194)	5,2 ± 0,6 (n=208)	0,069 ²
Hb F ; média ± dp	0,6 ± 0,6 (n=14)	0,5 ± 0,6 (n=194)	0,5 ± 0,6 (n=208)	0,623 ²
VCM ; média ± dp	68,2 ± 6,6 (n=14)	62,9 ± 5 (n=194)	63,3 ± 5,3 (n=208)	<0,001 ²
GV ; média ± dp	5,6 ± 0,6 (n=14)	5,6 ± 0,7 (n=194)	5,6 ± 0,6 (n=208)	0,989 ²
GV categorizado				
Abaixo	0/14 (0%)	3/194 (1,5%)	3/208 (1,4%)	1
Neutro	3/14 (21,4%)	40/194 (20,6%)	43/208 (20,7%)	
Acima	11/14 (78,6%)	151/194 (77,8%)	162/208 (77,9%)	
Hb ; média ± dp	12,3 ± 1,4 (n=14)	11,3 ± 1,3 (n=194)	11,4 ± 1,3 (n=208)	0,004 ²
Hb categorizado				
Abaixo	9/14 (64,3%)	161/194 (83%)	170/208 (81,7%)	0,142
Neutro	5/14 (35,7%)	33/194 (17%)	38/208 (18,3%)	
Acima	0/14 (0%)	0/194 (0%)	0/208 (0%)	
Ht ; média ± dp	38 ± 4 (n=14)	35 ± 3,7 (n=194)	35,2 ± 3,7 (n=208)	0,004 ²
Ht categorizado				
Abaixo	4/14 (28,6%)	122/194 (62,9%)	126/208 (60,6%)	0,02
Neutro	10/14 (71,4%)	72/194 (37,1%)	82/208 (39,4%)	
Acima	0/14 (0%)	0/194 (0%)	0/208 (0%)	
RDW ; média ± dp	16,5 ± 2,6 (n=14)	16,1 ± 1,2 (n=194)	16,1 ± 1,3 (n=208)	0,270 ²
RDW categorizada				
Neutro	5/14 (35,7%)	53/194 (27,3%)	58/208 (27,9%)	0,541
Acima	9/14 (64,3%)	141/194 (72,7%)	150/208 (72,1%)	
Green_e_King ; média ± dp	62,1 ± 11,3 (n=14)	57 ± 10,7 (n=194)	57,4 ± 10,8 (n=208)	0,087 ²
Green e King categorizado				
Abaixo	8/14 (57,1%)	166/194 (85,6%)	174/208 (83,7%)	0,014
Acima	6/14 (42,9%)	28/194 (14,4%)	34/208 (16,3%)	

(1) Teste exato de Fisher

As mutações causadoras de beta-talassemia, CD 39, IVS-I-6 e IVS-I-110, foram detectadas na maior parte do grupo de pacientes sugestivos de beta-talassemia. As diferenças no perfil hematológico e, no perfil de hemoglobinas desses casos, estão representadas na Figura 16.

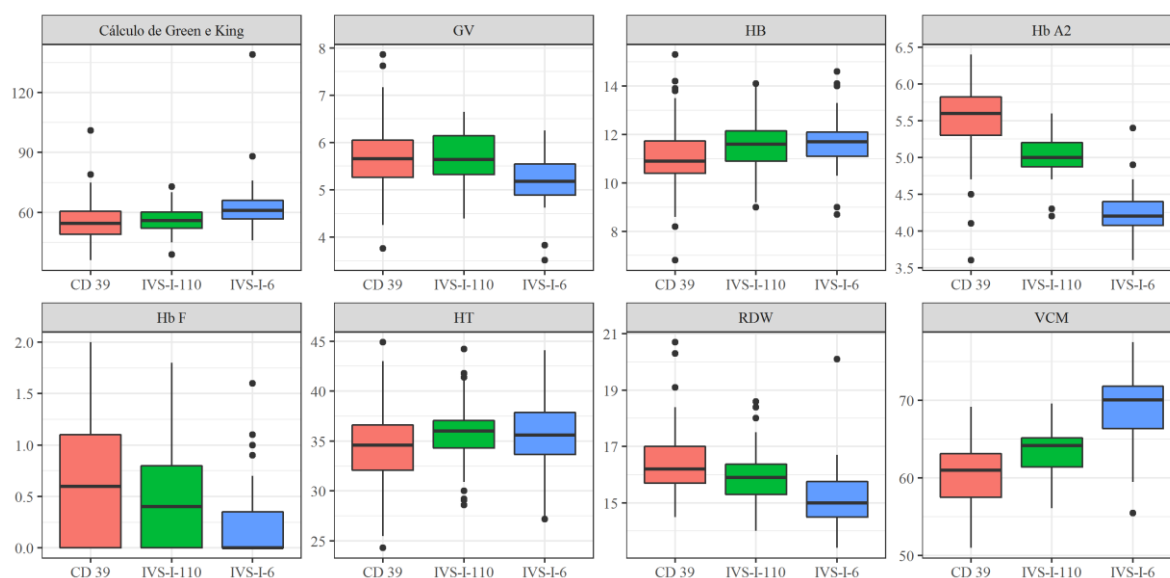


Figura 16. Representação esquemática da comparação dos perfis, hematológico e de hemoglobinas, entre as mutações causadoras de beta-talassemia (CD 39, IVS-I-110 e IVS-I-6) mais prevalentes nos pacientes do grupo 1.

4.2 Grupo 2: Casos sugestivos de alfa-talassemia

As 292 amostras selecionadas como sugestivas de alfa-talassemia, apresentavam microcitose no hemograma, em associação às dosagens normais de Hb A2, Hb Fetal e ferritina. Os parâmetros de Hb A2 e Hb Fetal das 292 amostras analisados no teste de eletroforese de hemoglobinas, por método capilar, estavam dentro do valor de referência, e por este motivo foram considerados normais (2,0-3,5% e 0,0-2,0%, respectivamente).

Todas as 292 amostras foram submetidas à reação de Gap-PCR Multiplex para pesquisar às duas deleções causadoras de alfa-talassemia mais frequentes no Brasil, $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$ (Figura 17).

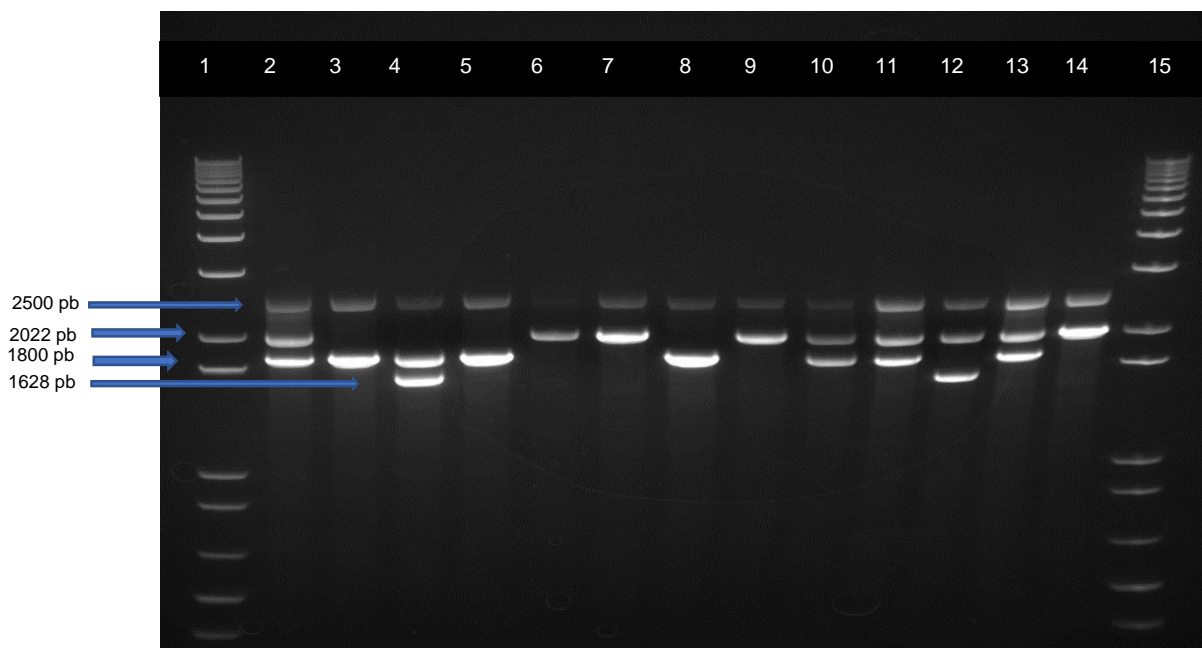


Figura 17. Padrão de bandas após amplificação usando a técnica de Gap-PCR Multiplex. As colunas 1 e 15 correspondem ao padrão de peso molecular 1 Kb Plus Ladder (Invitrogen®); a coluna 2 ao controle positivo para a deleção $-\alpha^{3.7}$, onde observam-se 3 bandas, a da amplificação do gene LIS, com 2500 pb, a do alelo α deletado com 2022 pb, e a terceira do alelo α normal de 1800 kb. A banda de 2500 pb observada em todas as amostras corresponde ao gene LIS, utilizado com controle de funcionamento de reação. A coluna 3 representa o controle negativo, ou seja, ao perfil de um indivíduo com genótipo normal, caracterizado pela presença da banda de 1800 pb do gene α -globina. As colunas 5 e 8 correspondem às amostras de indivíduos com genótipo normal. A coluna 4 corresponde a um indivíduo com deleção $-\alpha^{4.2}$ em heterozigose. As colunas 10, 11 e 13 correspondem às amostras de indivíduos com a deleção $-\alpha^{3.7}$ em heterozigose. As colunas 6, 7, 9 e 14 correspondem aos indivíduos com deleção $-\alpha^{3.7}$ em homozigose. A coluna 12 corresponde a um indivíduo com as deleções $\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$ em heterozigose composta.

Das 292 amostras submetidas ao teste de Gap-PCR Multiplex, 180 (61,6%) apresentaram resultado positivo para as deleções pesquisadas; e 112 amostras (38,4%) foram negativas para as deleções interrogadas. Os resultados obtidos na técnica de Gap-PCR Multiplex, estão discriminados na Tabela 8.

Tabela 8. Resultados da técnica de Gap-PCR Multiplex para pesquisa de deleções causadoras de alfa-talassemia.

Resultado Gap-PCR Multiplex	Quantidade de amostras
Deleção $-\alpha^{3.7}$ em heterozigose	124/292 (42,5%)
Deleção $-\alpha^{3.7}$ em homozigose	54/292 (18,5%)
Deleção $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$ em heterozigose composta	1/292 (0,3%)
Deleção $-\alpha^{4.2}$ em heterozigose	1/292 (0,3%)
Negativo	112/292 (38,4%)

Os dados referentes à idade, estado e sexo, das amostras sugestivas de alfa-talassemia, estão na Tabela 9. As amostras oriundas do estado de SP, representaram 58,9% do total de amostras deste grupo. Em relação ao sexo das amostras, 65,4% dos casos eram do sexo feminino. O perfil hematológico da série vermelha (GV, HT, HB, VCM, RDW e cálculo de Green e King) e de hemoglobinas (Hb A2 e Hb F), dos casos positivos e negativos na pesquisa de alfa-talassemia encontram-se descritos na Tabela 10.

Tabela 9. Descrição dos dados de idade, estado e sexo, dos casos sugestivos de alfa-talassemia, segundo resultado da técnica de Gap-PCR Multiplex.

Variáveis		Alfa-talassemia Gap-PCR Multiplex			p ¹
		Negativa (n=112)	Positiva (n=180)	Total (n=292)	
Idade (anos) média ± dp		27,2 ± 22,2 (n=112)	27,5 ± 19,9 (n=180)	27,4 ± 20,7 (n=292)	0,912 ²
Estado					0,001
	BA	1/112 (0,9%)	12/180 (6,7%)	13/292 (4,5%)	
	PE	1/112 (0,9%)	4/180 (2,2%)	5/292 (1,7%)	
	PR	3/112 (2,7%)	4/180 (2,2%)	7/292 (2,4%)	
	RJ	19/112 (17%)	60/180 (33,3%)	79/292 (27,1%)	
	RS	9/112 (8%)	7/180 (3,9%)	16/292 (5,5%)	
	SP	79/112 (70,5%)	93/180 (51,7%)	172/292 (58,9%)	
Sexo					0,9
	Feminino	74/112 (66,1%)	117/180 (65%)	191/292 (65,4%)	
	Masculino	38/112 (33,9%)	63/180 (35%)	101/292 (34,6%)	

(1) Teste exato de Fisher

(2) Teste t-student

Tabela 10. Perfil hematológico e de hemoglobinas dos casos sugestivos de alfa-talassemia, segundo resultado da técnica de Gap-PCR Multiplex.

Variáveis	Alfa-talassemia Gap-PCR Multiplex			p ¹
	Negativa (n=112)	Positiva (n=180)	Total (n=292)	
Hb A2; média ± dp	2,6 ± 0,3 (n=112)	2,6 ± 0,3 (n=180)	2,6 ± 0,3 (n=292)	0,497 ²
Hb F; média ± dp	0,1 ± 0,3 (n=112)	0,1 ± 0,3 (n=180)	0,1 ± 0,3 (n=292)	0,143 ²
VCM; média ± dp	75,4 ± 4,3 (n=112)	73,4 ± 4,4 (n=180)	74,2 ± 4,5 (n=292)	<0,001 ²
GV; média ± dp	5 ± 0,5 (n=112)	5,1 ± 0,5 (n=180)	5,1 ± 0,5 (n=292)	0,047 ²
GV categorizado				
Abaixo	2/112 (1,8%)	1/180 (0,6%)	3/292 (1%)	0,24
Neutro	70/112 (62,5%)	101/180 (56,1%)	171/292 (58,6%)	
Acima	40/112 (35,7%)	78/180 (43,3%)	118/292 (40,4%)	
Hb; média ± dp	12,4 ± 1,6 (n=112)	12,1 ± 1,3 (n=180)	12,3 ± 1,4 (n=292)	0,080 ²
Hb categorizado				
Abaixo	42/112 (37,5%)	88/180 (48,9%)	130/292 (44,5%)	0,031
Neutro	68/112 (60,7%)	92/180 (51,1%)	160/292 (54,8%)	
Acima	2/112 (1,8%)	0/180 (0%)	2/292 (0,7%)	
Ht; média ± dp	37,5 ± 3,9 (n=112)	37,3 ± 3,6 (n=180)	37,4 ± 3,7 (n=292)	0,729 ²
Ht categorizado				
Abaixo	30/112 (26,8%)	46/180 (25,6%)	76/292 (26%)	0,104
Neutro	79/112 (70,5%)	134/180 (74,4%)	213/292 (72,9%)	
Acima	3/112 (2,7%)	0/180 (0%)	3/292 (1%)	
Ferritina				
média ± dp	65,6 ± 38,8 (n=112)	74,9 ± 47,9 (n=180)	71,3 ± 44,7 (n=292)	0,201 ³
mediana [quartis]	55 [38 - 83,2] (n=112)	62 [40,8 - 99] (n=180)	58,5 [38,8 - 91,2] (n=292)	
Ferritina categorizada				
Abaixo	0/112 (0%)	0/180 (0%)	0/292 (0%)	1
Neutro	112/112 (100%)	180/180 (100%)	292/292 (100%)	
Acima	0/112 (0%)	0/180 (0%)	0/292 (0%)	
RDW				
média ± dp	15,1 ± 2,8 (n=112)	14,9 ± 1,4 (n=180)	15 ± 2,1 (n=292)	0,070 ³
mediana [quartis]	14,3 [13,4 - 15,4] (n=112)	14,6 [14 - 15,4] (n=180)	14,6 [13,7 - 15,4] (n=292)	
RDW categorizado				
Neutro	64/112 (57,1%)	101/180 (56,1%)	165/292 (56,5%)	0,904
Acima	48/112 (42,9%)	79/180 (43,9%)	127/292 (43,5%)	
Green e king				
média ± dp	70,6 ± 19,6 (n=112)	66,5 ± 12,8 (n=180)	68 ± 15,8 (n=292)	0,381 ³
mediana [quartis]	66,5 [58 - 76] (n=112)	65,5 [58 - 72,2] (n=180)	66 [58 - 73,2] (n=292)	
Green e King categorizado				
Abaixo	54/112 (48,2%)	87/180 (48,3%)	141/292 (48,3%)	1
Acima	58/112 (51,8%)	93/180 (51,7%)	151/292 (51,7%)	

(1) Teste exato de Fisher

(2) Teste t-student

(3) Teste de Mann-Whitney

Dentre as amostras positivas no teste de Gap-PCR Multiplex, 126 indivíduos apresentaram deleções em heterozigose ($-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$, e $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$ em heterozigose composta), e outros 54 indivíduos apresentaram deleção $-\alpha^{3.7}$ em homozigose. O perfil hematológico da série vermelha, entre os casos heterozigotos e homozigotos, está contemplado na Tabela 11. A diferença nos valores de VCM, GV, HB e RDW, entre os dois grupos, foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (Figura 18).

Tabela 11. Comparação do perfil hematológico da série vermelha, entre os pacientes positivos heterozigotos ou homozigotos, no teste de Gap-PCR Multiplex.

Variáveis	Alfa-talassemia (Gap-PCR Multiplex positiva)			p ¹
	HOMOZIGOSE (n=54)	HETEROZIGOSE (n=126)	Total (n=180)	
VCM ; média \pm dp	70 \pm 2,9 (n=54)	74,9 \pm 4,2 (n=126)	73,4 \pm 4,4 (n=180)	<0,001 ²
GV ; média \pm dp	5,3 \pm 0,6 (n=54)	5 \pm 0,5 (n=126)	5,1 \pm 0,5 (n=180)	<0,001 ²
Hb ; média \pm dp	11,8 \pm 1,3 (n=54)	12,3 \pm 1,2 (n=126)	12,1 \pm 1,3 (n=180)	0,012 ²
Ht ; média \pm dp	37,2 \pm 3,9 (n=54)	37,4 \pm 3,4 (n=126)	37,3 \pm 3,6 (n=180)	0,814
RDW				
média \pm dp	15,5 \pm 1,2 (n=54)	14,6 \pm 1,5 (n=126)	14,9 \pm 1,4 (n=180)	<0,001 ³
mediana [quartis]	15,4 [14,8 - 16,1] (n=54)	14,4 [13,8 - 14,9] (n=126)	14,6 [14 - 15,4] (n=180)	
Green e king				
média \pm dp	65,6 \pm 11,9 (n=54)	66,9 \pm 13,2 (n=126)	66,5 \pm 12,8 (n=180)	0,250 ³
mediana [quartis]	63 [58 - 69] (n=54)	66 [59 - 73,8] (n=126)	65,5 [58 - 72,2] (n=180)	

(1) Teste exato de Fisher

(2) Teste t-student

(3) Teste de Mann-Whitney

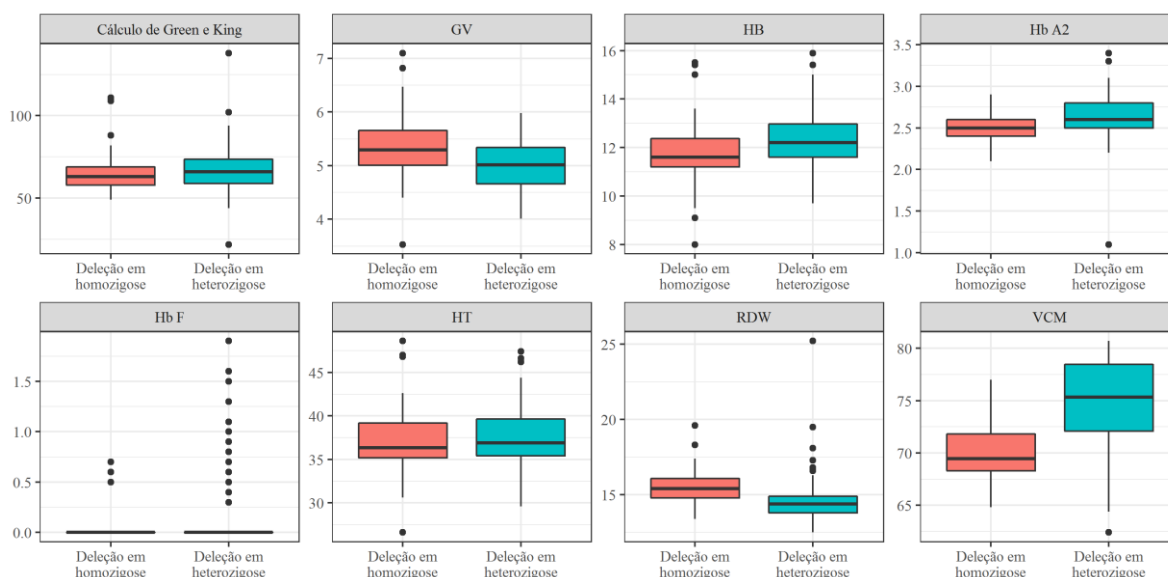


Figura 18. Representação esquemática da comparação dos perfis hematológico e de hemoglobinas, entre as deleções em homozigose e heterozigose, causadoras de alfa-talassemia.

Todas as amostras de indivíduos com resultado negativo no teste de Gap-PCR Multiplex, foram submetidas ao teste de MLPA. Dos 112 casos avaliados, encontraram-se 9 positivos, ou seja, com outras alterações moleculares no número de cópias dos genes *HBA* (Tabela 12). Na amostra de um indivíduo detectou-se uma deleção extensa (com aproximadamente 360 kb), em heterozigose, envolvendo todo o *cluster HBA*. Em consulta no banco de dados *HbVar*, não foi encontrado registro dessa deleção (Figura 19). Os demais resultados de MLPA, estão ilustrados nas Figuras, 20, 21, 22, 23, 24, respectivamente.

Tabela 12. Resultados da técnica de MLPA nas amostras Gap-PCR Multiplex negativas.

Resultado MLPA	Quantidade de amostras
Deleção de 360 kb*	1
Deleção HS-40 em heterozigose	1
Deleção $-\alpha^{3.7}$ em heterozigose	1
Deleção $--^{MED}$ em heterozigose	2
$-\alpha\alpha$ anti $^{3.7}$	4
Negativo	103

Nota: * Não foi encontrado registro dessa deleção na base de dados mundial de hemoglobinopatias, *HbVar*.

O paciente 275 teve resultado negativo na técnica de Gap-PCR Multiplex para à pesquisa das deleções $\alpha^{3.7}$ e $\alpha^{4.2}$. Entretanto, o resultado de MLPA para esse paciente demonstrou a presença da deleção $\alpha^{3.7}$ em heterozigose (Figura 21).

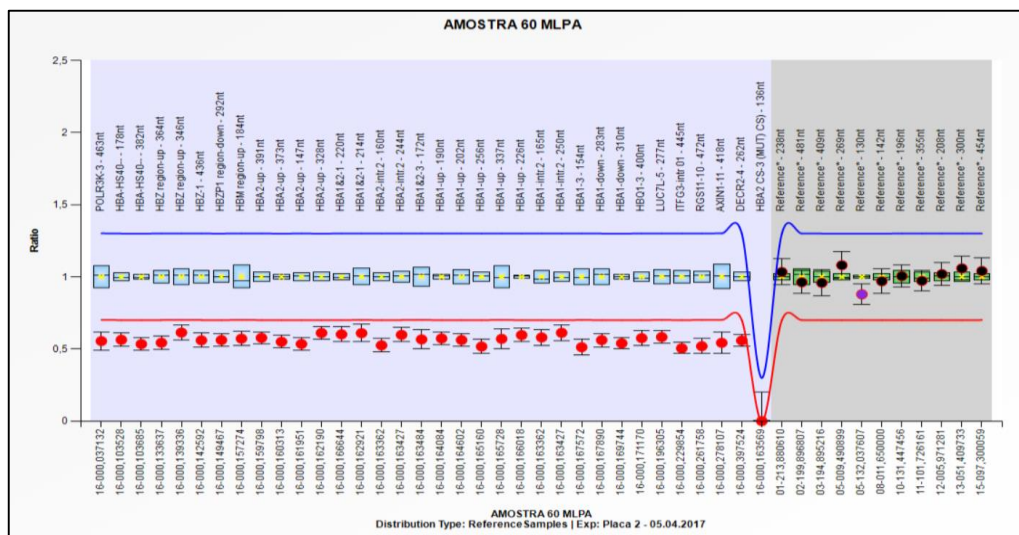


Figura 19. Resultado de MLPA do paciente 60. Deleção extensa (360 kb) envolvendo todo o *cluster* HBA em heterozigose, não descrita no *HbVar*.

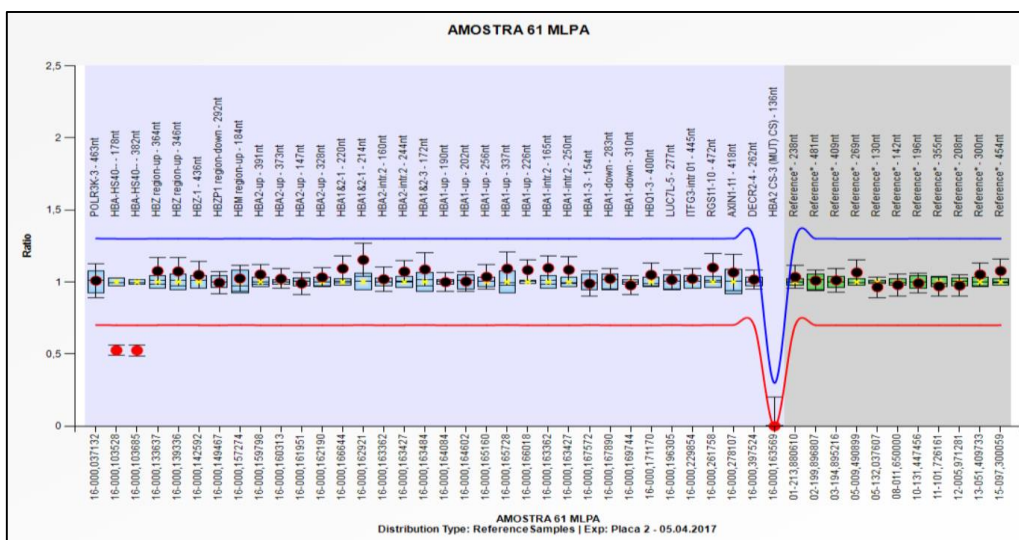


Figura 20. Resultado de MLPA do paciente 61. Deleção do elemento regulatório HS-40 (atualmente denominado MCS-R2) em heterozigose.

[illegible]

Figura 22. Resultado de MLPA do paciente 44. Deleção --^{MED} em heterozigose.

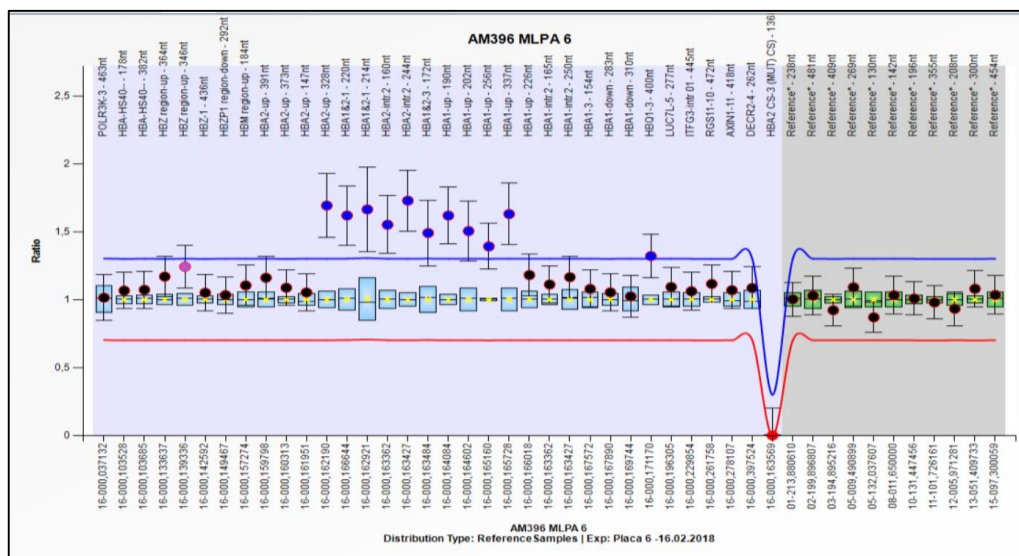


Figura 23. Resultado de MLPA do paciente 396. Triplicação $\alpha\alpha\alpha$ anti 3.7.

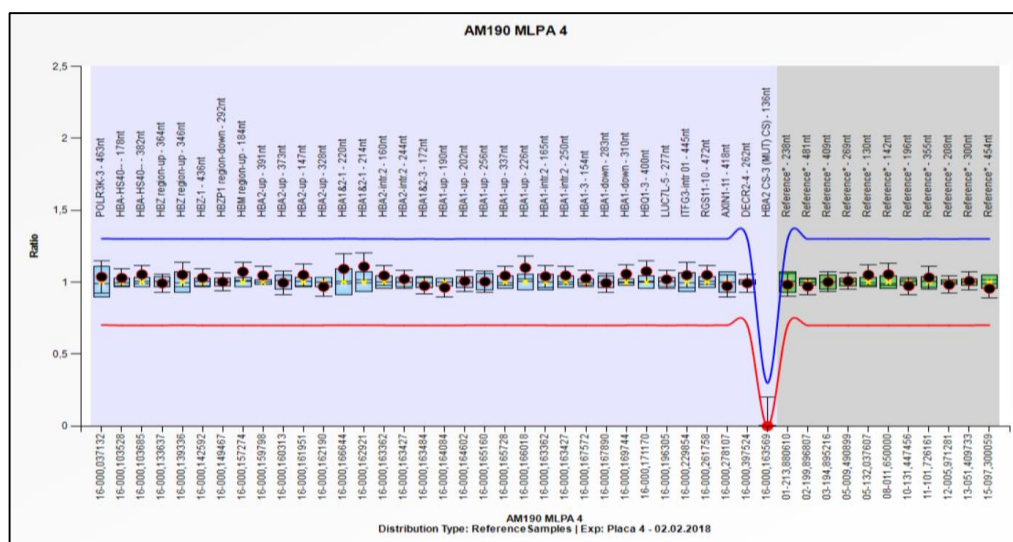


Figura 24. Resultado de MLPA do paciente 190. Resultado negativo, representado pela ausência de alterações moleculares nos genes e *cluster HBA*.

4.3 Comparação das talassemias alfa e beta

De acordo com os critérios de inclusão estabelecidos para este estudo, 500 amostras foram selecionadas, sendo 208 casos sugestivos de beta-talassemia e, 292 sugestivos de alfa-talassemia. A beta-talassemia foi confirmada em 194 casos, e a alfa-talassemia em 189 casos. As principais diferenças no perfil hematológico da série vermelha, e no perfil de hemoglobinas, entre os casos positivos dessas doenças, encontram-se descritas na Tabela 13, e ilustradas na Figura 25. Todos os parâmetros

de série vermelha (GV, HT, HB, VCM, RDW e cálculo de Green e King) apresentaram diferença significativa ($p=0,001$).

Tabela 13. Principais diferenças hematológicas entre as talassemias alfa e beta.

Variáveis	Alfa-talassemia (n=189)	Beta-talassemia (n=194)	Total (n=383)	p ¹
Idade (anos); média ± dp	27,7 ± 20 (n=189)	34,1 ± 20,5 (n=194)	30,9 ± 20,5 (n=383)	0,002 ²
Estado				
BA	12/189 (6,3%)	5/194 (2,6%)	17/383 (4,4%)	<0,001
PE	4/189 (2,1%)	3/194 (1,5%)	7/383 (1,8%)	
PR	5/189 (2,6%)	4/194 (2,1%)	9/383 (2,3%)	
RJ	61/189 (32,3%)	24/194 (12,4%)	85/383 (22,2%)	
RS	8/189 (4,2%)	18/194 (9,3%)	26/383 (6,8%)	
SP	99/189 (52,4%)	140/194 (72,2%)	239/383 (62,4%)	
Sexo				
Feminino	124/189 (65,6%)	123/194 (63,4%)	247/383 (64,5%)	0,67
Masculino	65/189 (34,4%)	71/194 (36,6%)	136/383 (35,5%)	
Hb A2; média ± dp	2,6 ± 0,3 (n=189)	5,1 ± 0,7 (n=194)	3,9 ± 1,4 (n=383)	<0,001 ²
Hb F; média ± dp	0,1 ± 0,3 (n=189)	0,5 ± 0,6 (n=194)	0,3 ± 0,5 (n=383)	<0,001 ²
VCM; média ± dp	73,4 ± 4,5 (n=189)	62,9 ± 5 (n=194)	68,1 ± 7,1 (n=383)	<0,001 ²
GV; média ± dp	5,1 ± 0,5 (n=189)	5,6 ± 0,7 (n=194)	5,3 ± 0,6 (n=383)	<0,001 ²
Hb; média ± dp	12,2 ± 1,3 (n=189)	11,3 ± 1,3 (n=194)	11,7 ± 1,4 (n=383)	<0,001 ²
Ht; média ± dp	37,3 ± 3,6 (n=189)	35 ± 3,7 (n=194)	36,2 ± 3,8 (n=383)	<0,001 ²
RDW				
média ± dp	14,9 ± 1,4 (n=189)	16,1 ± 1,2 (n=194)	15,5 ± 1,4 (n=383)	<0,001 ³
mediana [quartis]	14,6 [13,9 - 15,5] (n=189)	15,9 [15,3 - 16,7] (n=194)	15,3 [14,5 - 16,3] (n=383)	
Green e king				
média ± dp	66,4 ± 12,6 (n=189)	57 ± 10,7 (n=194)	61,7 ± 12,5 (n=383)	<0,001 ³
mediana [quartis]	65 [58 - 72] (n=189)	56 [51 - 62] (n=194)	60 [54 - 67] (n=383)	

(1) Teste exato de Fisher

(2) Teste t-student

(3) Teste de Mann-Whitney

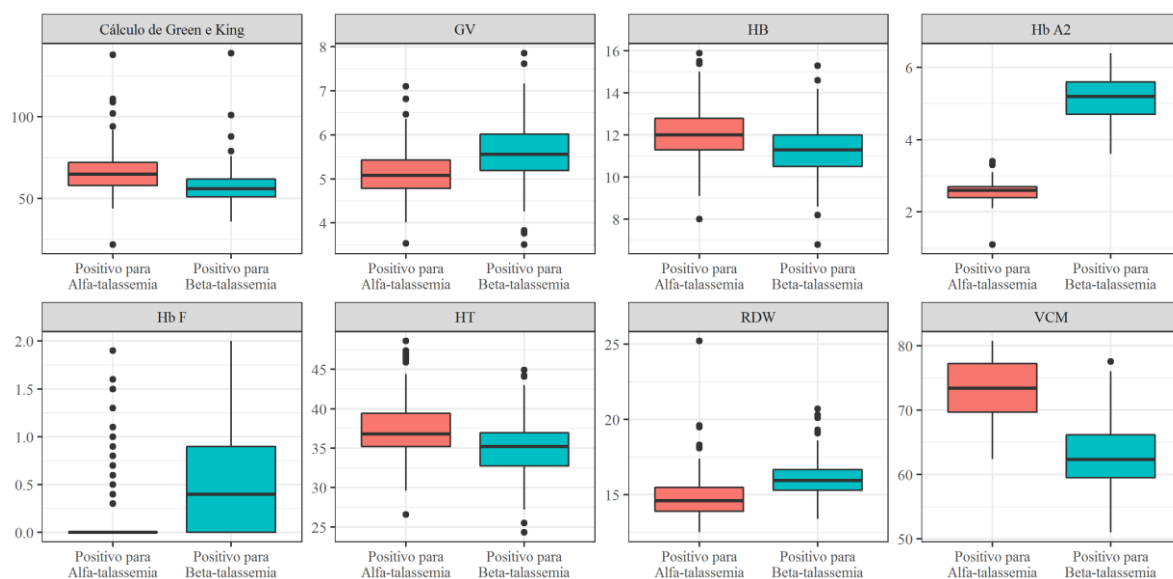


Figura 25. Representação esquemática da comparação dos perfis hematológico e de hemoglobinas, entre as talassemias alfa e beta.

5 DISCUSSÃO

Defeitos genéticos que afetam diretamente a taxa de produção das cadeias de globina alfa ou beta, dão origem às doenças monogênicas mais comuns em todo o mundo, as talassemias. As alfa e beta talassemias são distribuídas mundialmente, e esse fato se deve à migração intensa e generalizada de indivíduos das mais diversas populações. Uma das principais características laboratoriais observada nessas doenças é a presença de hemácias microcíticas e hipocrômicas na análise da série vermelha. Diversas técnicas podem ser empregadas para o diagnóstico laboratorial das talassemias, como eletroforese capilar, focalização isoelétrica, dosagem de hemoglobinas por HPLC, dentre outras. Todavia, somente o diagnóstico molecular, no qual são analisadas as sequências dos genes codificadores de alfa e beta globinas, é considerado definitivo.⁽⁶⁶⁾

No Brasil, alguns estudos envolvendo métodos moleculares para diagnóstico das talassemias foram realizados. Entretanto, a maioria desses estudos se limitou a avaliar indivíduos de regiões específicas do país. O presente estudo é o primeiro a investigar por metodologia molecular a ocorrência das talassemias alfa e beta, em amostras consecutivas e simultâneas de indivíduos de diferentes Estados do Brasil. Vale ressaltar que a população investigada nesse estudo, é composta de indivíduos que entraram com pedido de exame de eletroforese de hemoglobinas e hemograma em nosso serviço. Dessa forma, nossos dados não se referem às populações dos locais mencionados de forma geral, mas de indivíduos que, de alguma forma, tinham indicação clínica para solicitação dos exames especificados. Trata-se de uma limitação deste trabalho, portanto, extrapolar os dados de prevalência de alfa- e beta-talassemias para a população geral dos Estados incluídos.

Em relação a talassemia do tipo alfa, encontramos alguns trabalhos na literatura nacional em que o teste molecular foi utilizado. Nesses, avaliaram-se indivíduos da Bahia (Adorno e colaboradores)⁽⁵⁹⁾, Rio de Janeiro (Silva-Filho e colaboradores)⁽⁵⁸⁾, Rio Grande do Sul (Wagner e colaboradores)⁽⁶⁰⁾ e São Paulo (Borges e colaboradores)⁽⁶²⁾, para identificar alterações moleculares causadoras da alfa-talassemia.

Em comparação aos estudos acima referidos, a incidência da alfa-talassemia encontrada em nossa casuística da Bahia foi inferior (3%) à observada no estudo de Adorno e colaboradores em 2005 (22,2%)⁽⁵⁹⁾. Em ambos os estudos, somente a deleção $-\alpha^{3.7}$ foi detectada nas amostras de indivíduos do estado da Bahia.

Nas amostras provenientes do Rio de Janeiro, encontramos 7,5% de casos positivos para deleções no gene da alfa-globina, frequência superior à descrita na pesquisa de Silva-Filho e colaboradores (0,7%).⁽⁵⁸⁾ Nesta, os pesquisadores identificaram unicamente a deleção $-\alpha^{3.7}$ dentre os casos positivos. Em nossa casuística, foram encontradas as deleções $-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$ em heterozigose composta, e um caso com deleção extensa, envolvendo todo o *cluster* e genes *HBA* em heterozigose, não descrita na base de dados mundial de hemoglobinopatias, *HbVar*. A diferença entre as frequências encontradas nos dois estudos pode estar relacionada com a metodologia utilizada, que em nosso caso contou com a técnica de Gap-PCR Multiplex e MLPA, com consequente maior sensibilidade diagnóstica na nossa abordagem.

Sobre as amostras do Rio Grande do Sul, em 50% de nossa casuística foram encontradas deleções no gene alfa, com quase a totalidade dos indivíduos portando a deleção $-\alpha^{3.7}$ e um indivíduo portando triplicação do gene α ($-\alpha\alpha\alpha$ anti $^{3.7}$). Os dados de frequência foram superiores aos observados no estudo de Wagner e colaboradores (31,7%), em que se identificou somente a deleção $-\alpha^{3.7}$.⁽⁶⁰⁾ Naquele estudo, a alfa-talassemia foi pesquisada em amostras de indivíduos previamente selecionados devido à presença de anemia microcítica na análise da série vermelha. Em nosso estudo, os quadros sugestivos de alfa-talassemia foram selecionados devido à combinação de microcitose, dosagem de Hb A2 normal (2,0% a 3,5%) ou diminuída (<2,0%), e dosagem de ferritina normal. Nesse sentido, os critérios de seleção de amostras do nosso trabalho e o de Wagner e colaboradores se assemelham e os dados de frequência populacional são comparáveis no Estado do Rio Grande do Sul. Nas amostras oriundas do Estado de São Paulo, diagnosticamos 57,6% de indivíduos com alfa-talassemia, dentre os 172 selecionados. A frequência encontrada foi superior à comparada ao estudo de Borges e colaboradores (49,9%), no qual identificou-se a deleção $-\alpha^{3.7}$ e um caso da deleção $-\text{MED}$. Os indivíduos avaliados no estudo de Borges e colaboradores ⁽⁶²⁾, apresentavam microcitose e hipocromia, e ausência de anemia, na análise da série vermelha. A amostragem do estudo no Estado de São Paulo, da mesma forma que o estudo citado anteriormente do Rio Grande do Sul, foi selecionada de maneira semelhante aos nossos critérios de inclusão (microcitose e ausência de elevação nos níveis de Hb A2). Foram encontradas em nosso trabalho a deleção $-\alpha^{3.7}$; um caso de deleção do elemento regulatório HS-40 (atualmente denominado MCS-R2); dois casos da deleção $-\text{MED}$ e quatro casos de triplicação do gene α ($-\alpha\alpha\alpha$ anti $^{3.7}$).

Não encontramos na literatura nenhum estudo molecular que tenha investigado a alfa-talassemia em pacientes do Distrito Federal, Paraná e Pernambuco, impossibilitando comparações com os dados obtidos em nosso estudo naqueles Estados da Federação.

Em relação à talassemia do tipo beta, alguns estudos embasados em metodologia molecular foram realizados na população brasileira.

Recentemente, Gomes e colaboradores (2015) realizaram na cidade de Franca, SP, um estudo no qual foram identificadas as mutações causadoras de beta-talassemia CD39, IVS1-1, IVS1-6 e IVS1-110 em indivíduos beta-talassêmicos. A mutação CD39 foi encontrada em 44% dos indivíduos, seguida por IVS1-6 (36%) e IVS1-110 (16%). Em nosso estudo, os achados provenientes das amostras do estado de SP foram em grande parte semelhantes aos achados de Gomes e colaboradores. Em relação à mutação CD39, nossos resultados revelaram uma frequência similar (42,3%). A frequência da mutação IVS1-6, aqui avaliada foi inferior (19,2%) aos achados dos pesquisadores de Franca, enquanto a incidência da mutação IVS1-110 foi similar (17,3%). Gomes e colaboradores, porém, não detectaram a mutação IVS1-1. Em nosso estudo essa mutação foi identificada em 5,3% dos casos. ⁽⁶³⁾

Fonseca e colaboradores (2013), pesquisaram mutações causadoras de beta-talassemia em indivíduos do Estado da Bahia, e encontraram apenas um caso (0,1%) dentre as 1011 amostras avaliadas. A mutação detectada foi *HBB*: c.135delC. Em nosso trabalho, a frequência de casos positivos para mutações de beta-talassemia foi superior (1,3%). Detectamos as seguintes mutações em heterozigose: Códon 47, IVS-I-129, IVS-I-6, IVS-I-5 e CD 39. Tal diferença pode estar relacionada com a população avaliada em cada estudo. Nossa abordagem molecular foi aplicada em indivíduos que deram entrada em nosso serviço com pedido médico de eletroforese de hemoglobinas. Fonseca e colaboradores avaliaram indivíduos da população geral da Bahia, sem nenhuma indicação clínica. ⁽⁷⁶⁾

Reichert e colaboradores (2008), avaliaram 127 pacientes com elevação de Hb A2 no Estado do Rio Grande do Sul e encontraram uma frequência de 91,0% de casos positivos para beta-talassemia. Nosso estudo, que também avaliou amostras com Hb A2 elevada (>3,5%) e microcitose, revelou incidência comparável (94,7%) de beta-talassemia. A respeito das alterações detectadas, a frequência da mutação CD 39 foi inferior (38,9%) a encontrada no estudo de Reichert e colaboradores (50,9%). Observamos incidência superior (38,6%) para a mutação IVS-I-6, versus 9,5% no

estudo gaúcho. A frequência da mutação IVS1-110 foi muito semelhante entre os estudos: 16,7% e 18,1%. A mutação IVS1-1 foi detectada em 12,9% dos pacientes na pesquisa de Reichert e colaboradores. Em nosso estudo não detectamos essa alteração nas amostras no Estado do Rio Grande do Sul. Por outro lado, identificamos um caso com a mutação Códon 8 (-AA) (c.25_26 del AA) em heterozigose. ⁽⁷⁷⁾

Em estudo recente no Estado do Rio de Janeiro, Carrocini e colaboradores (2017), pesquisaram mutações no gene *HBB* em 24 indivíduos com beta-talassemia *major*, previamente diagnosticados, da instituição HEMORIO. As seguintes alterações genéticas foram encontradas em maior frequência: IVS-I-6 em 33,3% dos casos; seguida de 16,7% de IVS1-110 e, 3,9% de casos CD 39 positivos. ⁽⁷⁸⁾ Apesar da população avaliada no presente estudo não contemplar nenhum indivíduo com mutação causadora de beta-talassemia em homozigose (todas as mutações detectadas estavam em heterozigose), a frequência da mutação IVS-I-6 foi parecida (37,5%) com a encontrada na pesquisa de Carrocini e colaboradores. Também detectamos as mutações IVS1-110 e CD 39, em 8,3% e 29,2% dos casos, respectivamente.

Não encontramos na literatura consultada nenhum trabalho que tenha investigado a talassemia do tipo beta com metodologia molecular em pacientes do Distrito Federal, Paraná e Pernambuco.

5.1 Correlação das alterações moleculares com o perfil hematológico nas talassemias alfa e beta

Em nosso estudo avaliamos o perfil hematológico, por meio das variáveis da série vermelha (GV, HT, HB, VCM, RDW e Índice de Green e King) e os parâmetros de hemoglobinas (Hb A2 e Hb F), de todas as amostras, positivas e negativas, para alterações moleculares das talassemias alfa e beta.

No grupo de amostras sugestivas de beta-talassemia (208 casos), 93,3% dos casos foram positivos, e 6,7% negativos. A seleção das amostras desse grupo foi baseada na elevação de concentração da Hb A2 (>3,5%) em associação com níveis baixos de VCM. Apesar de não termos encontrado nenhuma mutação causadora de beta-talassemia em 6,7% dos pacientes, estes não apresentaram diferenças significativas de Hb A2 quando comparados aos pacientes com resultado positivo (média de 5,5% e 5,1%, respectivamente; $p=0,069$). Acreditamos que o desenho de nossos *primers* possa ter limitado à busca de mutações nesses pacientes, já que

muitas dessas se encontram em regiões de *introns* ou na região promotora do gene. Para confirmar se estes casos são realmente negativos, outro estudo com *primers*, que incluam as regiões intrônicas e promotora, faz-se necessário.

A maioria dos pacientes com resultados positivos, apresentou as seguintes mutações em heterozigose: CD 39 (c.118 C>T) em 42,3% dos casos; seguido de 19,2% de IVS-I-6 (c.92+6 T>C), e outros 17,3% da mutação IVS-I-110 (c.93-21 G>A). Dentre essas mutações mais prevalentes, nos pacientes neste estudo, os índices de VCM e a dosagem de Hb A2 merecem destaque pela significativa diferença ($p<0,001$).

Os pacientes com a mutação CD 39 positiva, apresentaram maior concentração de Hb A2 (5,6%) quando comparados aos pacientes com as mutações IVS-I-110 e IVS-I-6. Nessas últimas, a média da dosagem de Hb A2 foi de 5,0% e 4,2%, respectivamente. Em relação ao parâmetro de VCM, a média com o menor valor foi observada nos casos positivos para a mutação CD 39, correspondendo a 60,8 fL. Nos indivíduos com IVS-I-110 e IVS-I-6 positivas, as médias dos valores de VCM foram maiores: 63,4 e 69,0 fL, respectivamente.

Em estudo realizado na cidade de Ribeirão Preto, SP, Cominal e colaboradores (2015) determinaram a frequência das mutações CD39, IVS1-1, IVS1-6 e IVS1-110 em 50 indivíduos beta-talassêmicos (27 com beta-talassemia maior, e 23 com beta-talassemia traço), por meio da reação de PCR alelo específica (PCR-AE), e correlacionaram os achados moleculares com os perfis hematológico e de marcadores de reservas de ferro. Nossos valores de Hb A2 e VCM identificados nos pacientes com beta-talassemia em heterozigose, devido à presença da mutação IVS-I-110 (5,0% e 63,4 fL, respectivamente) são similares aos valores observados no estudo de Cominal e colaboradores (5,2% e 64,0 fL, respectivamente). Referente a mutação CD 39, a média de dosagem de Hb A2 observada em nosso estudo (5,6%) foi idêntica aos achados de Cominal e colaboradores (5,6%). Já em relação ao VCM, nossos achados foram inferiores (60,8 fL) quando comparados aos dos pesquisadores (66,2 fL). A comparação dos parâmetros de VCM e Hb A2 com o estudo acima referido foi realizada apenas com os dados obtidos dos pacientes com beta-talassemia traço (forma heterozigota da doença). Nesse grupo, identificou-se apenas as mutações CD39 e IVS1-110. ⁽⁷⁹⁾

Gomes e colaboradores (2017), determinaram a frequência das mutações CD39, IVS1-1, IVS1-6 e IVS1-110 em 25 indivíduos com beta-talassemia por meio da reação de PCR alelo específica (PCR-AE), na cidade de Franca, SP⁽⁶³⁾. Dos 25

pacientes avaliados por Gomes e colaboradores, 24 deles apresentavam beta-talassemia traço, e 1 paciente beta-talassemia maior. A mutação CD39 foi encontrada em 44% dos indivíduos, seguida por IVS1-6 (36%) e IVS1-110 (16%). Um paciente (4%) não apresentou nenhuma das mutações. Os cálculos estatísticos utilizados no estudo citado acima (análise linear multivariada), foram diferentes quando comparados aos do presente estudo. Entretanto, foi possível verificar que o VCM nos casos CD39 positivos também foi inferior, quando avaliados frente as mutações IVS1-6 e IVS1-110.

No grupo de amostras sugestivas de alfa-talassemia (292 casos), 64,7% dos casos foram positivos, e 35,3% negativos na pesquisa de alterações moleculares causadoras de alfa-talassemia. A seleção das amostras desse grupo foi baseada na combinação de microcitose, dosagem de Hb A2 normal (2,0% a 3,5%) ou diminuída (<2,0%), e dosagem de ferritina normal.

Utilizamos a técnica de Gap-PCR Multiplex adaptada, com o intuito de pesquisar as deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$ nos 292 casos. Essa metodologia demonstrou-se eficiente, detectando 180 de casos positivos (61,4%). A metodologia de MLPA foi empregada somente nos 112 casos negativos na técnica de Gap-PCR Multiplex. Dos 112 casos avaliados por MLPA, somente 9 foram positivos (8,0%).

Dentre os 189 casos positivos para alfa-talassemia (considerando as duas técnicas empregadas), a deleção $-\alpha^{3.7}$ foi a mais prevalente (94,7%), sendo representada na forma heterozigota (69,8%) e homozigota (30,2%). Nossos achados são condizentes com a literatura brasileira que apontam a deleção $-\alpha^{3.7}$ como a mais prevalente no país.⁽⁷⁴⁾ Nos demais casos positivos para alfa-talassemia (5,3%), foram detectadas as seguintes alterações moleculares em heterozigose: deleção $-\alpha^{4.2}$; deleção $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$ em heterozigose composta; deleção HS-40; deleção $--^{MED}$; deleção de 360 kb (não descrita no *HbVar*). Observou-se a triplicação $-\alpha\alpha\alpha$ anti $^{3.7}$ em 4 casos.

A avaliação do perfil hematológico da série vermelha e do perfil de hemoglobinas dos pacientes positivos para alfa-talassemia foi realizada de acordo com os resultados obtidos na técnica de Gap-PCR Multiplex devido ao maior número de casos positivos. Para tal comparação, dividimos os resultados em dois grupos: homozigotos e heterozigotos (Tabela 10). As principais diferenças notadas entre os grupos ($p < 0,001$) foram em relação aos parâmetros de VCM, GV e RDW. Os pacientes homozigotos apresentaram maior índice de microcitose quando comparados aos heterozigotos.

Rodríguez e colaboradores, avaliaram 129 indivíduos com alfa-talassemia na cidade de Madrid, Espanha (2017). Os pesquisadores avaliaram a correlação dos parâmetros da série vermelha frente ao número de genes alfas deletados nos 129 pacientes. As deleções avaliadas estavam em heterozigose e em homozigose.⁽³⁵⁾ O estudo revelou que os parâmetros de VCM, RDW e HB foram mais baixos ($p < 0,05$) nos indivíduos homozigotos. As seguintes médias de valores foram identificadas nos pacientes homozigotos e heterozigotos do referido estudo, respectivamente: VCM 70,7 fL e 77,7 fL; RDW 14,7% e 13,9%, HB 12,6 g/dL e 13,7 g/dL. Nosso estudo apresentou resultados similares aos observados por Rodríguez e colaboradores nos parâmetros VCM, RDW e HB. Observamos nos pacientes homozigotos e heterozigotos, os seguintes valores, respectivamente: VCM 70,0 fL e 74,9 fL; RDW 15,5% e 14,6%, HB 11,8 g/dL e 12,3 g/dL. Os resultados de ambos estudos indicam que os pacientes com deleções causadoras de alfa-talassemia em homozigose apresentam perfil hematológico de série vermelha mais alterados do que os indivíduos heterozigotos.

Encontramos em nosso estudo dois casos de alfa-talassemia devido à deleção $-^{MED}$ em heterozigose. Em relação ao perfil hematológico e de hemoglobinas, não se observou diferenças significativas quando comparado aos demais casos positivos de alfa-talassemia. Os dois casos com deleção $-^{MED}$ foram identificados nas amostras provenientes do Estado de São Paulo. Detectamos essa alteração molecular por meio da técnica de MLPA. Estudos na população brasileira que relatam pacientes com deleção $-^{MED}$ são escassos. Sonati e colaboradores (2000) avaliaram 34 indivíduos previamente diagnosticados com alfa-talassemia, sendo 7 pacientes com doença de Hb H, e os outros 27 com alterações estruturais nos genes da alfa-globina. Esses pacientes eram oriundos da região Sudeste do Brasil.⁽⁸⁰⁾ Em um dos pacientes com doença de Hb H, a deleção $-^{MED}$ foi identificada em heterozigose composta com a deleção $-\alpha^{3.7}$. Nesse estudo não foram relatadas informações referentes ao perfil hematológico e de hemoglobinas dos pacientes avaliados.

Dos 189 casos positivos para alfa-talassemia em nosso estudo, detectamos apenas um paciente com deleção do elemento regulatório principal MCS-R2 (anteriormente denominado HS-40) em heterozigose. Essa deleção foi encontrada em amostra proveniente do Estado de São Paulo. Essa alteração molecular no *cluster HBA* só foi identificada devido ao emprego da técnica de MLPA. Ao avaliar o perfil de série vermelha e de hemoglobinas deste caso com os demais casos positivos, não

observamos diferenças significativas. Mota e colaboradores (2017) estudaram 5 pacientes com suspeita de alfa-talassemia na cidade de Campinas, SP, por meio da metodologia MLPA.⁽⁸¹⁾ Dentre os 5 pacientes estudados por Mota e colaboradores, um paciente foi diagnosticado com alfa-talassemia devido deleção do elemento regulatório principal MCS-R2 em heterozigose. Os demais casos apresentaram outras alterações moleculares no gene e *cluster HBA*. O perfil hematológico de série vermelha e o perfil de hemoglobinas foi avaliado nesse estudo. O paciente com a deleção MCS-R2, apresentou os seguintes valores: GV 5,5 $10^6/\text{mm}^3$; HB 11,2 g/dL; VCM 65,3 fL; Hb A2 2,6%; Hb F 0,6%. Os dados obtidos em nosso estudo (GV 4,87 $10^6/\text{mm}^3$; HB 10,5 g/dL; VCM 69,4 fL; Hb A2 2,7%; Hb F 0,0%) foram similares.

Apesar de não termos encontrado nenhuma alteração molecular causadora de alfa-talassemia em 35,3% dos pacientes, estes não apresentaram diferenças significativas no perfil hematológico da série vermelha e no perfil de hemoglobinas. A única exceção foi em relação ao parâmetro de VCM ($p < 0,001$), que nos casos negativos apresentou-se discretamente aumentado (75,7 fL) em relação ao grupo de indivíduos positivos (73,4 fL). Embora os valores de VCM tenham sido avaliados como tendo diferença significativa do ponto de vista estatístico, a diferença entre os dois grupos pode ser considerada praticamente irrelevante no ponto de vista laboratorial. Apesar de nossa casuística ter sido baseada em amostras com microcitose e dosagem de Hb A2 e ferritina normais (o que poderia em primeiro momento indicar ausência de anemia ferropriva), nós não avaliamos o uso de sulfato ferroso nessa população. Desta forma, não podemos excluir a hipótese de que, dentre esses 35,3% de casos negativos, existam indivíduos portadores de anemia ferropriva em tratamento. Na anemia ferropriva, a microcitose é considerada um dos principais achados laboratoriais.⁽⁷¹⁾

6 CONCLUSÕES

- Este estudo representa o primeiro do Brasil a investigar a alfa-talassemia em amostras consecutivas de indivíduos com microcitose sem causas óbvias; a identificar a presença de mutações causadoras de beta-talassemia nos pacientes com microcitose e elevação de Hb A2; e a determinar a prevalência de ambas as condições em diferentes regiões do Brasil: Bahia, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo.
- Dentre os Estados avaliados, o Paraná apresentou maior frequência de casos positivos para alfa-talassemia quando comparado aos demais estados. A beta-talassemia foi observada em maior frequência em amostras oriundas do Estado Rio Grande do Sul.
- A metodologia de Gap-PCR multiplex foi eficaz na detecção de 95,2% dos casos positivos para alfa-talassemia. Essa técnica apresenta baixo custo e pode ser implementada na prática laboratorial como técnica molecular de triagem para alfa-talassemia. Considerando que a técnica de MLPA apresenta alto custo, impossibilitando adesão na maior parte dos centros diagnósticos do país, nossos resultados indicam que a mesma pode ser empregada nos casos em que a triagem por Gap-PCR multiplex tenha sido negativa.
- A grande quantidade de indivíduos diagnosticados com alfa-talassemia neste estudo (64,7%), indica que essa condição é subdiagnosticada no Brasil, e ressalta a importância da análise molecular para investigar as causas de microcitose nos casos em que as hipóteses mais comuns, como a beta-talassemia e a anemia ferropriva tenham sido excluídas. O diagnóstico correto obtido por meio de técnicas moleculares, evita o tratamento equivocado e desnecessário de ferro, comumente observado na prática clínica.
- A deleção $-\alpha^{3.7}$ representou a maior causa de alfa-talassemia nos pacientes avaliados neste estudo. Dentre os casos positivos, identificou-se a deleção em 94,7% dos casos. Essa deleção foi diagnosticada nas amostras dos Estados: Bahia, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo. Esse achado é

condizente com a literatura brasileira que aponta a deleção $-\alpha^{3.7}$ como a mais prevalente do Brasil.

- Detectamos mutações causadoras de beta-talassemia em 93,3% dos indivíduos com elevação de Hb A2 em associação a microcitose. A partir dessa informação, é possível inferir que os testes atualmente utilizados na rotina laboratorial, como eletroforese de hemoglobinas associado à análise de série vermelha, são capazes de diagnosticar indivíduos beta-talassêmicos.

- As mutações CD 39, IVS-I-6 e IVS-I-110 foram as mais frequentes. O sequenciamento de DNA pelo método de Sanger, demonstrou-se eficiente na detecção das mutações.

-As diferenças no perfil hematológico e no perfil de hemoglobinas observadas nas mutações CD 39, IVS-I-6, IVS-I-110 causadoras de beta-talassemia, assim como nos casos de alfa-talassemia em heterozigose e homozigose, indicam que os genótipos influenciam o quadro clínico-laboratorial.

7 REFERÊNCIAS

1. Sabath DE. Molecular Diagnosis of Thalassemias and Hemoglobinopathies: An ACLPS Critical Review. *Am J Clin Pathol*. 2017;148(1):6-15.
2. Thom CS, Dickson CF, Gell DA, Weiss MJ. Hemoglobin variants: biochemical properties and clinical correlates. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2013;3(3):a011858.
3. Clarke GM, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. *Clin Chem*. 2000;46(8 Pt 2):1284-90.
4. Schechter AN. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood*. 2008;112(10):3927-38.
5. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ*. 2001;79(8):704-12.
6. Greene DN, Vaughn CP, Crews BO, Agarwal AM. Advances in detection of hemoglobinopathies. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2015;439:50-7.
7. Higgs DR, Engel JD, Stamatoyannopoulos G. Thalassaemia. *Lancet*. 2012;379(9813):373-83.
8. Ryan K, Bain BJ, Worthington D, James J, Plews D, Mason A, et al. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. *Br J Haematol*. 2010;149(1):35-49.
9. Mettananda S, Higgs DR. Molecular Basis and Genetic Modifiers of Thalassemia. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2018;32(2):177-91.
10. Ribeiro DM, Sonati MF. Regulation of human alpha-globin gene expression and alpha-thalassemia. *Genet Mol Res*. 2008;7(4):1045-53.
11. Voon HP, Vadolas J. Controlling alpha-globin: a review of alpha-globin expression and its impact on beta-thalassemia. *Haematologica*. 2008;93(12):1868-76.
12. Wu MY, He Y, Yan JM, Li DZ. A novel selective deletion of the major alpha-globin regulatory element (MCS-R2) causing alpha-thalassaemia. *Br J Haematol*. 2017;176(6):984-6.
13. Thein SL. Genetic modifiers of beta-thalassemia. *Haematologica*. 2005;90(5):649-60.
14. Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia. *Genet Med*. 2010;12(2):61-76.
15. Shang X, Xu X. Update in the genetics of thalassemia: What clinicians need to know. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2017;39:3-15.

16. Bain BJ. Haemoglobinopathy diagnosis: algorithms, lessons and pitfalls. *Blood Rev.* 2011;25(5):205-13.
17. Backes CE, Mallmann FG, Dassi T, Bazzo ML, Santos-Silva MC. Triagem neonatal como um problema de saúde pública. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.* 2005;27:43-7.
18. Weatherall D. The inherited disorders of haemoglobin: an increasingly neglected global health burden. *Indian J Med Res.* 2011;134:493-7.
19. Williams TN, Weatherall DJ. World distribution, population genetics, and health burden of the hemoglobinopathies. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* 2012;2(9):a011692.
20. Piel FB. The Present and Future Global Burden of the Inherited Disorders of Hemoglobin. *Hematology/oncology clinics of North America.* 2016;30(2):327-41.
21. Taher AT, Weatherall DJ, Cappellini MD. Thalassaemia. *Lancet.* 2018;391(10116):155-67.
22. Taylor SM, Parobek CM, Fairhurst RM. Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2012;12(6):457-68.
23. Giardine B, Borg J, Viennas E, Pavlidis C, Moradkhani K, Joly P, et al. Updates of the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Database issue):D1063-9.
24. Ware RE, de Montalembert M, Tshilolo L, Abboud MR. Sickle cell disease. *Lancet.* 2017;390(10091):311-23.
25. Piel FB, Howes RE, Patil AP, Nyangiri OA, Gething PW, Bhatt S, et al. The distribution of haemoglobin C and its prevalence in newborns in Africa. *Sci Rep.* 2013;3:1671.
26. Fucharoen S, Weatherall DJ. The hemoglobin E thalassemias. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* 2012;2(8).
27. Orlando GM, Naoum PC, Siqueira FAM, Bonini-Domingos CR. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.* 2000;22:111-21.
28. Soares LF, Lima EM, Silva JAd, Fernandes SS, Silva KMdC, Lins SP, et al. Prevalência de hemoglobinas variantes em comunidades quilombolas no estado do Piauí, Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva.* 2017;22:3773-80.
29. Huttle A, Maestre GE, Lantigua R, Green NS. Sickle cell in Latin America and the United States [corrected]. *Pediatr Blood Cancer.* 2015;62(7):1131-6.

30. Ramalho AS, Magna LA, Silva RBdPe. A Portaria MS n.º 822/01 e a triagem neonatal das hemoglobinopatias. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2002;24:244-50.
31. Wong P, Fuller PJ, Gillespie MT, Milat F. Bone Disease in Thalassemia: A Molecular and Clinical Overview. *Endocr Rev*. 2016;37(4):320-46.
32. Rachmilewitz EA, Giardina PJ. How I treat thalassemia. *Blood*. 2011;118(13):3479-88.
33. De Sanctis V, Eleftheriou A, Malaventura C, Thalassaemia International Federation Study Group on G, Endocrine Complications in T. Prevalence of endocrine complications and short stature in patients with thalassaemia major: a multicenter study by the Thalassaemia International Federation (TIF). *Pediatr Endocrinol Rev*. 2004;2 Suppl 2:249-55.
34. Clark BE, Thein SL. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. *Clin Lab Haematol*. 2004;26(3):159-76.
35. Velasco-Rodriguez D, Blas C, Alonso-Dominguez JM, Vega G, Soto C, Garcia-Raso A, et al. Cut-Off Values of Hematologic Parameters to Predict the Number of Alpha Genes Deleted in Subjects with Deletional Alpha Thalassemia. *Int J Mol Sci*. 2017;18(12).
36. Komvilaisak P, Jetsrisuparb A, Fucharoen G, Komwilaisak R, Jirapradittha J, Kiatchoosakun P. Clinical Course of Homozygous Hemoglobin Constant Spring in Pediatric Patients. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2018;40(5):409-12.
37. Songdej D, Babbs C, Higgs DR, Consortium BI. An international registry of survivors with Hb Bart's hydrops fetalis syndrome. *Blood*. 2017;129(10):1251-9.
38. Vichinsky EP. Clinical manifestations of alpha-thalassemia. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2013;3(5):a011742.
39. Farashi S, Harteveld CL. Molecular basis of alpha-thalassemia. *Blood Cells Mol Dis*. 2018;70:43-53.
40. Higgs DR, Gibbons RJ. The molecular basis of alpha-thalassemia: a model for understanding human molecular genetics. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2010;24(6):1033-54.
41. He S, Li J, Huang P, Zhang S, Lin L, Zuo Y, et al. Characterization of Hb Bart's Hydrops Fetalis Caused by $\alpha\alpha$ -(SEA) and a Large Novel $\alpha(0)$ -Thalassemia Deletion. *Hemoglobin*. 2018;42(1):61-4.
42. Lafferty JD, Barth DS, Sheridan BL, McFarlane AG, Halchuk LM, Raby A, et al. A multicenter trial of the effectiveness of zeta-globin enzyme-linked immunosorbent assay and hemoglobin H inclusion body screening for the detection of $\alpha(0)$ -thalassemia trait. *Am J Clin Pathol*. 2008;129(2):309-15.

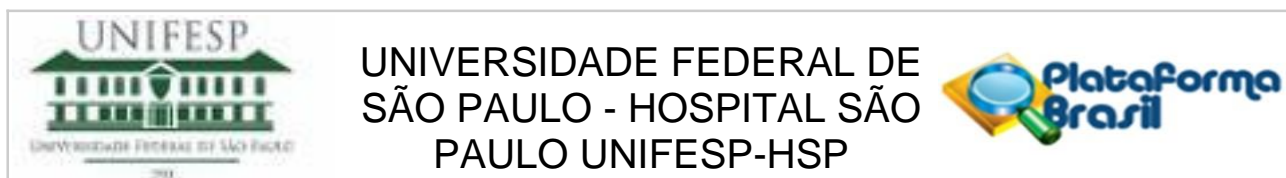
43. Musharraf SG, Iqbal A, Ansari SH, Parveen S, Khan IA, Siddiqui AJ. beta-Thalassemia Patients Revealed a Significant Change of Untargeted Metabolites in Comparison to Healthy Individuals. *Sci Rep*. 2017;7:42249.
44. Thein SL. Molecular basis of beta thalassemia and potential therapeutic targets. *Blood Cells Mol Dis*. 2018;70:54-65.
45. De Sanctis V, Kattamis C, Canatan D, Soliman AT, Elsedfy H, Karimi M, et al. beta-Thalassemia Distribution in the Old World: an Ancient Disease Seen from a Historical Standpoint. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2017;9(1):e2017018.
46. Thein SL. The molecular basis of beta-thalassemia. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2013;3(5):a011700.
47. Origa R. beta-Thalassemia. *Genet Med*. 2017;19(6):609-19.
48. Karim MF, Ismail M, Hasan AM, Shekhar HU. Hematological and biochemical status of Beta-thalassemia major patients in Bangladesh: A comparative analysis. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*. 2016;10(1):7-12.
49. Brancaleoni V, Di Pierro E, Motta I, Cappellini MD. Laboratory diagnosis of thalassemia. *Int J Lab Hematol*. 2016;38 Suppl 1:32-40.
50. Asadov C, Alimirzoeva Z, Mammadova T, Aliyeva G, Gafarova S, Mammadov J. beta-Thalassemia intermedia: a comprehensive overview and novel approaches. *Int J Hematol*. 2018;108(1):5-21.
51. Leecharoenkiat K, Lithanatudom P, Sornjai W, Smith DR. Iron dysregulation in beta-thalassemia. *Asian Pac J Trop Med*. 2016;9(11):1035-43.
52. Choudhry VP. Thalassemia Minor and Major: Current Management. *Indian J Pediatr*. 2017;84(8):607-11.
53. Aliyeva G, Asadov C, Mammadova T, Gafarova S, Abdulalimov E. Thalassemia in the laboratory: pearls, pitfalls, and promises. *Clin Chem Lab Med*. 2018.
54. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(12):e57.
55. Sorensen KM, Andersen PS, Larsen LA, Schwartz M, Schouten JP, Nygren AO. Multiplex ligation-dependent probe amplification technique for copy number analysis on small amounts of DNA material. *Anal Chem*. 2008;80(23):9363-8.
56. Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *Int J Mol Sci*. 2012;13(3):3245-76.

57. Alcoforado GHdM, Bezerra CM, Lemos TMAjM, Oliveira DMd, Kimura EM, Costa FF, et al. Prevalence of \pm -thalassemia 3.7 kb deletion in the adult population of Rio Grande do Norte, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*. 2012;35:594-8.
58. Silva Filho IL, Gonçalves MS, Adôrno EV, Campos DP, Fleury MK. Triagem de hemoglobinopatias e avaliação da degeneração oxidativa da hemoglobina em trabalhadores portadores do traço falciforme (HbAS), expostos a riscos ocupacionais. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2005;27:183-7.
59. Adorno EV, Couto FD, Moura Neto JPd, Menezes JF, Rêgo M, Reis MGd, et al. Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*. 2005;21:292-8.
60. Wagner SC, Castro SMd, Gonzalez TP, Santin AP, Filippon L, Zaleski CF, et al. Prevalence of common \pm -thalassemia determinants in south Brazil: importance for the diagnosis of microcytic anemia. *Genetics and Molecular Biology*. 2010;33:641-5.
61. Sonati MF, Farah SB, Ramalho AS, Costa FF. High prevalence of alpha-thalassemia in a black population of Brazil. *Hemoglobin*. 1991;15(4):309-11.
62. Borges E, Wenning MRSC, Kimura EM, Gervásio SA, Costa FF, Sonati MF. High prevalence of α -thalassemia among individuals with microcytosis and hypochromia without anemia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2001;34:759-62.
63. Gomes WR, Santos RA, Cominal JG, Tavares CFF. Frequencies of CD39, IVS1-1, IVS1-6 and IVS1-110 mutations in beta-thalassemia carriers and their influence on hematimetric indices. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2017;53:362-7.
64. Rocha LBdS, Martins MF, Pinheiro G. Distribuição das mutações da alfa-talassemia em Fortaleza, Ceará. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2010;46:437-41.
65. Silveira ZMLd. Caracterização molecular e laboratorial da talassemia beta e da interação hemoglobina S/talassemia beta. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2010;32:425-6.
66. Goonasekera HW, Paththinige CS, Dissanayake VHW. Population Screening for Hemoglobinopathies. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2018.
67. Joly P, Pondarre C, Badens C. [Beta-thalassemias: molecular, epidemiological, diagnostical and clinical aspects]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2014;72(6):639-68.
68. Barrett AN, Saminathan R, Choolani M. Thalassaemia screening and confirmation of carriers in parents. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2017;39:27-40.

69. Néri IA, Lourenço GJ, Falconi MA, Souza HAS, Wenning M, Lima CSP. Clinical and laboratory analyses for the identification of Alpha Thalassemia. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2005;27:142-3.
70. Gilad O, Shemer OS, Dgany O, Krasnov T, Nevo M, Noy-Lotan S, et al. Molecular diagnosis of alpha-thalassemia in a multiethnic population. *Eur J Haematol*. 2017;98(6):553-62.
71. Van Vranken M. Evaluation of microcytosis. *Am Fam Physician*. 2010;82(9):1117-22.
72. Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, Cutting GR. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of alpha-thalassemia. *Blood*. 2000;95(1):360-2.
73. Wagner SC, de Castro SM, Gonzalez TP, Santin AP, Filippon L, Zaleski CF, et al. Prevalence of common alpha-thalassemia determinants in south Brazil: Importance for the diagnosis of microcytic anemia. *Genet Mol Biol*. 2010;33(4):641-5.
74. de Souza RA, Carlos AM, de Souza BM, Rodrigues CV, Pereira Gde A, Moraes-Souza H. Alpha-Thalassemia: Genotypic Profile Associated with Ethnicity and Hematological Differentiation of Iron Deficiency Anemia in the Region of Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Hemoglobin*. 2015;39(4):264-9.
75. Reddy PL, Bowie LJ. Sequence-based diagnosis of hemoglobinopathies in the clinical laboratory. *Clin Lab Med*. 1997;17(1):85-96.
76. Fonseca SF, Moura Neto JP, Goncalves MS. Prevalence and molecular characterization of beta-thalassemia in the state of Bahia, Brazil: first identification of mutation HBB: c.135delC in Brazil. *Hemoglobin*. 2013;37(3):285-90.
77. Reichert VC, de Castro SM, Wagner SC, de Albuquerque DM, Hutz MH, Leistner-Segal S. Identification of beta thalassemia mutations in South Brazilians. *Ann Hematol*. 2008;87(5):381-4.
78. Carrocini GCS, Venancio LPR, Pessoa VLR, Lobo CLC, Bonini-Domingos CR. Mutational Profile of Homozygous beta-Thalassemia in Rio de Janeiro, Brazil. *Hemoglobin*. 2017;41(1):12-5.
79. COMINAL JG. Mutações causadoras de beta-talassemia em Ribeirão Preto-SP: identificação e correlação com o fenótipo da doença. [Dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2015.
80. Wenning MR, Kimura EM, Costa FF, Saad ST, Gervasio S, de Jorge SB, et al. alpha-globin genes: thalassemic and structural alterations in a Brazilian population. *Braz J Med Biol Res*. 2000;33(9):1041-5.
81. Mota NO, Kimura EM, Ferreira RD, Pedroso GA, Albuquerque DM, Ribeiro DM, et al. Rare alpha0-thalassemia deletions detected by MLPA in five unrelated Brazilian patients. *Genet Mol Biol*. 2017;40(4):768-73.

Anexos

Anexo 1- Aprovação do comitê de ética em pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Alfa e beta-talassemias: prevalência em diferentes regiões do país, bases moleculares e aspectos diagnósticos

Pesquisador: Nathalya Cristina Lavelle

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 58173316.4.0000.5505

Instituição Proponente: Disciplinas de Hematologia e Hemoterapia do Departamento de Oncologia

Patrocinador Principal: Fleury S.A.

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.751.859

Apresentação do Projeto:

Nº CEP: 1034/2016 As hemoglobinopatias são condições hereditárias caracterizadas por mutações nos genes que codificam as cadeias globínicas. Essas mutações podem causar alterações qualitativas, pela substituição de aminoácidos que resultam no aparecimento de hemoglobinas variantes; ou alterações quantitativas, quando há redução na síntese de cadeias globínicas, dando origem às talassemias. Atualmente, os testes laboratoriais mais utilizados no diagnóstico das hemoglobinopatias são a dosagem de hemoglobina por cromatografia líquida de alta definição (HPLC) ou por eletroforese capilar.

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)5571-1062

Fax: (11)5539-7162

E-mail: secretaria.cepunifesp@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - HOSPITAL SÃO
PAULO UNIFESP-HSP



Na rotina laboratorial do Grupo Fleury são recebidas amostras de várias regiões do país. Para estabelecer um cenário inicial, realizamos um estudo retrospectivo da frequência de amostras provenientes dos estados atendidos por nosso serviço (Bahia, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo) e das principais hemoglobinopatias encontradas nesses estados. Analisamos 16.326 exames de eletroforese de hemoglobinas consecutivos, que foram realizados recentemente (julho de 2014 a julho de 2015), provenientes dessas seis regiões. Identificamos 665 casos de beta-talassemia em heterozigose; e 996 amostras com hemoglobina A2 normal ou diminuída, microcitose e concentração de ferritina normal. Esse perfil pode indicar pacientes com as formas mais brandas de alfa-talassemia, em que há deleção de um ou dois genes de alfa-globina, sendo necessário o emprego de técnicas moleculares para o diagnóstico definitivo. Tendo como base esse levantamento retrospectivo, neste projeto propomos a realização de um estudo prospectivo, com amostras consecutivas, embasado em metodologia molecular, que permitirá caracterizar de forma inequívoca os casos com microcitose e ausência de elevação na concentração de hemoglobina A2, comumente referidos como "sugestivos de alfa-talassemia". Além disso, iremos caracterizar, do ponto de vista molecular, as mutações que mais frequentemente dão origem aos casos de beta-talassemia em nossa casuística. Assim, o objetivo deste trabalho será avaliar a prevalência e o perfil hematológico, laboratorial e molecular dos indivíduos portadores de alfa e beta-talassemias em diferentes regiões do Brasil.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral: Avaliar a prevalência, perfil hematológico e molecular dos indivíduos portadores de alfa e beta-talassemias em diferentes regiões do Brasil.

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5571-1062

Fax: (11)5539-7162

E-mail: secretaria.cepunifesp@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - HOSPITAL SÃO
PAULO UNIFESP-HSP



Objetivos Específicos: 1- Investigar, por meio de métodos moleculares, a ocorrência da alfa-talassemia em pacientes com microcitose, hemoglobina A2 <3,5% e concentração de ferritina normal; 2- Validar e padronizar a técnica de análise de número de cópias do gene da alfa-globina por MLPA (Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification), em associação à técnica de GAP-PCR multiplex para o diagnóstico molecular da alfa-talassemia; 3- Caracterizar o perfil hematológico (hemograma e ferritina) e molecular dos pacientes com beta-talassemia atendidos em nosso serviço; 4- Validar e padronizar a técnica de sequenciamento de DNA do gene da beta globina pelo método de Sanger para identificação de mutações associadas à beta-talassemia.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos mínimos, dado que as amostras terão sido colhidas por ocasião da investigação clínica a que o paciente foi submetido por critérios médicos, sem necessidade de coleta de amostras adicionais.

Benefícios: Descrição da prevalência das alterações moleculares em pacientes com microcitose e suspeita clínica de talassemia ou hemoglobinopatias em diferentes regiões do País, o que poderá habilitar a proposição de novos algoritmos diagnósticos para indivíduos submetidos a este tipo de investigação. Desenvolvimento de novos métodos moleculares para investigação de talassemias e hemoglobinopatias.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo com o objetivo acadêmico de Mestrado, vinculado ao Programa de Pós-graduação da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia, Campus São Paulo. Pesquisadora Executante: Nathalya Cristina Lavelle. Orientadora: Gisele Wally Braga Colleoni Pesquisadores Associados: Edgar Gil Rizzatti; Maria Carolina Tostes Pintão; Ana Maria Fraga Unidade Executora: Área de Pesquisa e Desenvolvimento do Grupo Fleury; Departamento de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5571-1062

Fax: (11)5539-7162

E-mail: secretaria.cepunifesp@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - HOSPITAL SÃO
PAULO UNIFESP-HSP



Metodologia Proposta: Neste estudo serão utilizadas três metodologias distintas para caracterização molecular das alfa e beta-talassemias. Será realizada também a análise de hemograma e a análise do perfil bioquímico do ferro de todas as amostras. O sequenciamento de DNA pelo método de Sanger será aplicado em amostras de pacientes com beta-talassemia, para determinar quais mutações de pontos estão envolvidas nesta doença. Em casos com suspeita de alfa-talassemia, o GAP-PCR Multiplex e a técnica de MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) serão utilizadas. O GAPPCR Multiplex é uma metodologia que envolve reação em cadeia de polimerase (PCR), onde são utilizados primers específicos para determinar a presença ou ausência de deleções causadoras de alfa-talassemia. A técnica de MLPA é também utilizada para determinar deleções no gene da alfa globina humana, através do uso de sondas específicas para todo o cluster do gene da alfa globina humana. **Critério de Inclusão:** Serão incluídos todos os casos consecutivos que entrarem com pedido para realização do teste eletroforese de hemoglobinas no setor de Hematologia do Grupo Fleury. Para a investigação molecular, serão selecionadas as seguintes situações:

- Alfa-talassemia: Amostras com hemoglobina A2 normal ou diminuída ($<3,5\%$) em eletroforese capilar; com hemoglobina fetal normal, concentração de ferritina normal e microcitose.
- Beta-talassemia: Amostras com hemoglobina A2 aumentada ($\geq 3,5\%$) em eletroforese capilar, com hemoglobina fetal normal e microcitose.

Critério de Exclusão: Amostras hemolisadas; Amostras com volume insuficiente; amostras de indivíduos com idade igual ou inferior a 1 ano e 11 meses.

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5571-1062

Fax: (11)5539-7162

E-mail: secretaria.cepunifesp@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - HOSPITAL SÃO
PAULO UNIFESP-HSP



Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos obrigatórios apresentados: Folha de Rosto; Projeto Detalhado (Projeto_Nathalya.docx); Declaração de Instituição e Infraestrutura carta_fleury.pdf; TCLE (justificativa_Nathalya.doc) para NÃO obtenção do TCLE.

Justificativa do pesquisador: Solicito a dispensa do uso do termo de consentimento livre e esclarecido na realização do projeto intitulado "Alfa e beta talassemias: prevalência em diferentes regiões do país, bases moleculares e aspectos diagnósticos", tendo em vista que utilizaremos amostras já coletadas para os mesmos fins diagnósticos no setor de Eletroforese de Hemoglobinas do Grupo Fleury, com o intuito de validar métodos de investigação molecular já consagrados pela prática, que nos habilitem a investigar as bases moleculares das talassemias alfa e beta, as quais não podem ser completamente caracterizadas pela rotina laboratorial vigente. O resultado esperado deste projeto é apenas a validação e conhecimento de metodologias moleculares, ou seja, independente do resultado não haverá nenhum impacto clínico para os pacientes. Todas as amostras envolvidas nesta pesquisa serão descaracterizadas antes de serem submetidas à análise molecular. Vale ressaltar, que o exame de Eletroforese de Hemoglobinas só é realizado na central técnica do Fleury Jabaquara, em São Paulo, SP, recebendo em torno de 1.500 amostras por mês provenientes de todo o país, e que todas as amostras do setor são desprezadas após a realização dos exames. Desta forma, peço a compreensão e autorização deste Comitê para que o uso do termo de consentimento livre e esclarecido seja dispensado, uma vez que a sua aplicação neste caso seria inviável, pois não conseguiríamos abranger todos os pacientes.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5571-1062

Fax: (11)5539-7162

E-mail: secretaria.cepunifesp@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - HOSPITAL SÃO
PAULO UNIFESP-HSP



Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP informa que a partir da data de aprovação final, é necessário o envio de relatórios semestrais (no caso de estudos pertencentes à área temática especial) e anuais (em todas as outras situações). É também obrigatória, a apresentação do relatório final, quando do término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor		Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_751188.pdf	27/07/2016 13:34:06			Aceito
Outros	folha_rosto2.pdf	27/07/2016 13:32:31	Nathalya Lavelle	Cristina	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto1.pdf	27/07/2016 13:31:44	Nathalya Lavelle	Cristina	Aceito
Declaração de Instituição e	carta_fleury.pdf	27/07/2016 13:27:21	Nathalya Lavelle	Cristina	Aceito
Infraestrutura	carta_fleury.pdf	27/07/2016 13:27:21	Nathalya Lavelle	Cristina	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	justificativa_Nathalya.doc	15/07/2016 14:28:31	Nathalya Lavelle	Cristina	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Nathalya.docx	07/07/2016 20:03:06	Nathalya Lavelle	Cristina	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SÃO PAULO, 29 de setembro de 2016

Assinado por:
Miguel Roberto Jorge
(Coordenador)

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)5571-1062

Fax: (11)5539-7162

E-mail: secretaria.cepunifesp@gmail.com

Apêndices

Apêndice 1 – Dados e resultados dos pacientes com suspeita de alfa-talassemia

FICHA	HbA2	HbF	SEXO	IDADE	ESTADO	VCM	GV	Hb	Ht	FERRITINA	RDW	Green e King	RESULTADO GAP-PCR	RESULTADO MLPA
8	2,4%	0,0%	F	41	SP	78,6	4,68	12,2	36,8	48	15,3	77	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
9	2,9%	0,7%	M	6	RJ	66,4	5,38	11,6	35,7	35	15,3	58	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	POSITIVO ALFA 3.7 HETEROZIGOSE
10	2,6%	0,0%	F	3	RJ	70,1	5,08	12,2	35,6	52	14,3	58	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	POSITIVO ALFA 3.7 HETEROZIGOSE
11	3,1%	0,8%	M	5	SP	71,6	5,31	13,0	38,0	41	13,6	54	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
12	2,9%	0,0%	M	52	SP	78,3	5,44	15,4	42,6	136	14,7	59	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
13	2,6%	0,0%	M	32	RJ	78,3	5,20	13,8	40,7	186	13,8	61	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	POSITIVO ALFA 3.7 HETEROZIGOSE
18	2,7%	0,0%	M	12	RS	77,7	5,66	15,6	44,0	49	13,2	51	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
19	2,9%	0,0%	M	12	RJ	77,9	4,93	11,5	38,4	65	14,7	78	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
24	2,4%	0,8%	F	32	SP	79,5	4,59	12,0	36,5	70	13,4	71	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
25	2,7%	0,7%	F	30	SP	77,0	5,00	11,6	38,5	57	13,5	69	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	POSITIVO ALFA 3.7 HETEROZIGOSE
26	3,1%	1,6%	F	2	SP	68,8	5,38	12,3	37,0	13	14,6	56	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	POSITIVO ALFA 3.7 (B) HETEROZIGOSE
27	2,4%	0,0%	F	57	RJ	76,9	5,40	13,8	41,5	80	14,9	64	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
28	2,5%	0,0%	F	21	SP	80,4	4,54	11,5	36,5	31	15,3	86	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
29	2,1%	1,9%	M	12	SP	78,0	4,68	13,0	36,5	39	12,3	58	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
30	2,5%	0,0%	M	15	SP	73,9	5,29	12,7	39,1	64	15,3	66	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
34	2,4%	1,0%	F	23	RJ	76,2	4,37	11,4	33,3	26	14,7	75	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
35	3,0%	0,0%	F	6	BA	76,9	4,89	12,2	37,6	32	13,1	63	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
36	2,5%	0,0%	M	30	SP	68,5	7,10	15,4	48,6	222	16,0	49	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	POSITIVO ALFA 3.7 HOMOZIGOSE
41	2,5%	1,3%	M	2	RJ	66,8	5,48	12,5	36,6	23	13,3	47	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
42	2,7%	0,0%	M	13	RJ	72,0	5,60	13,3	40,3	36	14,8	58	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
43	2,6%	0,0%	F	33	SP	71,2	4,72	11,0	33,6	70	15,3	71	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	POSITIVO ALFA 3.7 HOMOZIGOSE
44	2,4%	0,0%	F	63	SP	66,5	5,43	11,2	36,1	153	16,0	63	GAP - PCR NEGATIVO	POSITIVO --MED 1 HETEROZIGOSE
45	2,5%	0,0%	F	45	RJ	68,3	5,15	11,3	35,2	45	14,1	58	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
57	2,7%	0,0%	F	36	SP	79,6	4,02	10,7	32,0	100	14,1	83	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
58	2,2%	0,0%	F	40	RJ	68,4	5,41	12,1	37,0	34	16,4	63	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
59	2,9%	0,5%	F	7	SP	75,0	5,11	12,4	38,3	78	13,5	61	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
60	2,4%	0,6%	M	6	RJ	66,1	4,75	10,0	31,4	52	14,6	64	GAP - PCR NEGATIVO	POSITIVO -deleção de 360 kb
61	2,7%	0,0%	F	35	SP	69,4	4,87	10,5	33,8	88	17,0	78	GAP - PCR NEGATIVO	POSITIVO HS-40 HETEROZIGOSE
62	2,3%	0,0%	F	38	SP	68,3	4,57	9,9	31,2	51	16,2	76	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
63	2,5%	0,0%	F	14	SP	78,8	4,96	12,1	39,1	126	13,3	68	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
64	2,4%	0,5%	M	13	SP	68,1	5,68	12,5	38,7	53	15,2	56	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	

65	2,8%	0,0%	F	15	RS	71,1	5,08	11,9	36,1	114	14,3	61	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
66	2,7%	0,0%	M	13	SP	79,2	4,71	12,9	37,3	41	13,7	67	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
67	2,6%	0,0%	F	48	SP	79,1	4,54	11,1	35,9	32	16,3	92	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
68	2,9%	0,0%	F	35	BA	69,1	5,27	11,1	36,4	99	16,2	70	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
74	2,2%	0,0%	F	29	SP	80,0	4,74	12,2	37,9	44	14,6	77	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
75	2,4%	0,0%	F	28	RJ	77,7	4,70	12,0	36,5	63	13,7	69	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
76	2,6%	0,0%	M	48	BA	79,9	5,83	14,7	46,6	158	14,3	62	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
77	2,6%	0,0%	M	65	SP	75,6	5,37	12,7	40,6	69	18,6	84	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
78	2,5%	0,0%	F	27	SP	79,9	4,43	11,3	35,4	143	14,5	82	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
79	2,6%	0,0%	M	12	SP	75,0	5,15	12,8	38,6	71	14,2	62	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
80	2,8%	0,0%	F	9	SP	69,6	5,52	12,7	38,4	44	13,5	51	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
85	2,1%	0,0%	M	7	SP	64,3	5,15	9,9	33,1	54	18,7	78	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
86	2,7%	0,0%	F	7	SP	76	4,58	11,5	34,8	50	14,2	71	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
87	2,9%	1,3%	M	7	SP	73,8	5,41	14,1	39,9	35	13,2	51	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
88	2,8%	0,0%	F	11	SP	77,5	5,02	13,3	38,9	48	13,7	62	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
89	2,5%	0,0%	F	32	SP	80,7	4,55	12,1	36,7	111	14,2	76	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
90	2,5%	0,0%	F	37	RJ	70,8	4,00	9,3	28,3	31	16,5	89	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
91	2,5%	0,0%	F	48	SP	79,3	4,58	11,8	36,3	94	13,9	74	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
92	2,8%	0,0%	F	9	SP	76,0	4,67	12,6	35,5	84	13,1	60	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
95	2,8%	0,0%	M	51	SP	80,0	4,76	13,4	38,1	222	12,8	61	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
96	2,6%	0,0%	F	54	SP	78,3	5,08	12,7	39,8	54	13,8	67	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
97	2,3%	0,0%	F	52	SP	80,0	5,11	13,6	40,9	36	14,2	67	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
104	2,7%	1,5%	F	2	SP	72,5	4,91	11,3	35,6	34	14,2	66	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
105	2,4%	0,0%	F	55	RJ	76,1	5,44	13,1	41,4	27	19,5	86	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
106	2,7%	0,0%	F	48	SP	79,6	5,82	15,5	46,3	63	17,2	70	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
107	2,3%	0,0%	M	26	SP	75,0	5,59	14,0	41,9	55	15,9	64	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
108	2,6%	0,0%	F	7	SP	76,5	5,23	13,5	40,0	72	13,0	56	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
109	3,0%	0,0%	F	21	PR	70,6	5,27	12,5	37,2	95	14,8	59	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
110	3,5%	0,0%	M	89	RJ	68,6	4,81	10,1	33,0	108	15,8	74	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
111	2,8%	0,0%	F	21	SP	75,1	4,25	10,5	31,9	81	14,6	78	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
118	2,4%	0,0%	F	41	SP	69,7	4,91	11,0	34,2	106	15,2	67	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
119	2,8%	0,0%	F	55	SP	78,7	5,53	13,7	43,5	27	14,7	66	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
120	2,6%	0,0%	F	31	RJ	79,1	4,50	11,8	35,6	87	13,6	72	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
121	2,5%	0,0%	F	11	SP	76,0	5,45	13,4	41,4	30	13,4	58	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
122	2,9%	0,0%	F	7	RJ	69,8	5,03	11,6	35,1	29	14,7	62	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
123	2,1%	0,0%	F	46	PR	69,4	5,75	13,5	39,9	98	14,5	52	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
124	2,6%	0,0%	F	14	RJ	75,5	5,19	13,1	39,2	47	14,2	62	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	

125	2,4%	0,0%	F	44	BA	67,8	5,78	12,0	39,2	57	15,4	59	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
126	2,7%	1,0%	M	2	SP	68,9	5,18	12,6	35,7	29	13,8	52	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
127	2,7%	0,0%	M	4	SP	68,6	4,52	10,6	31	22	15,3	68	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
128	2,7%	0,0%	M	8	SP	67,3	5,47	11,9	36,8	42	14,9	57	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
132	2,4%	0,0%	F	53	RJ	79,4	4,61	12,4	36,6	127	13,7	70	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
133	2,6%	0,0%	F	28	RS	78,3	5,34	14,6	41,8	48	13,2	55	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
134	2,6%	0,0%	F	74	RJ	70,8	4,97	11,2	35,2	138	15,3	68	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
135	2,2%	0,0%	F	16	SP	74,7	4,67	11,6	34,9	45	13,8	66	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
140	2,4%	0,0%	F	11	SP	76,5	5,07	12,4	38,8	96	14,4	22	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
141	2,3%	0,0%	F	72	RJ	74,9	5,34	12,8	40,0	128	15,5	68	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
142	2,4%	0,0%	F	69	BA	72,0	5,03	11,3	36,2	42	14,9	68	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
143	2,4%	0,0%	M	33	SP	68,9	6,82	15,0	47,0	174	17,0	54	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
150	2,3%	0,0%	F	32	SP	68,3	4,83	10,5	33,0	61	15,0	67	GAP - PCR NEGATIVO	POSITIVO --MED 1 HETEROZIGOSE
151	2,6%	0,0%	M	13	SP	79,7	5,43	14,1	43,3	75	14,9	67	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
152	2,8%	0,0%	M	15	RJ	79,7	5,37	15,2	42,8	71	13,2	55	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
153	2,4%	0,0%	F	47	SP	71,4	4,93	10,9	35,2	27	19,3	90	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
154	2,7%	0,7%	F	4	SP	73,3	5,05	13,1	37,0	47	12,8	52	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
155	2,6%	0,0%	F	7	RJ	74,3	4,32	10,8	32,1	105	13,7	70	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
156	3,0%	0,0%	M	2	SP	73,7	5,2	13,5	38,3	39	13,8	56	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
157	2,6%	0,0%	F	44	RJ	80,4	4,34	11,1	34,9	74	14,2	83	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
158	2,3%	0,0%	M	58	RJ	79,2	4,56	12,2	36,1	168	13,6	70	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
162	2,2%	0,0%	F	63	SP	76,0	5,66	13,7	43,0	118	15,9	67	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
163	2,0%	0,0%	F	51	SP	70,7	4,1	8,8	29,0	32	19,4	110	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
164	2,7%	0,0%	F	17	RS	75,6	5,08	13,1	38,4	85	13,9	61	GAP - PCR NEGATIVO	POSITIVO -αα anti 3.7
165	2,7%	0,3%	F	2	SP	72,5	5,13	12,3	37,2	58	14,2	61	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
166	2,8%	0,0%	F	19	PE	79,4	4,42	11,7	35,1	91	13,1	71	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
173	2,5%	0,7%	F	51	RJ	67,1	5,11	11,4	34,3	27	15,8	62	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
174	2,6%	0,0%	M	9	SP	75,4	4,47	11,9	33,7	150	14,7	70	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
175	2,3%	0,0%	F	12	SP	70,0	5,04	11,0	35,3	66	20,3	90	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
176	2,4%	0,0%	F	74	RJ	74,1	4,48	10,8	33,2	76	16,2	82	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
177	2,6%	0,0%	F	43	SP	78,3	4,47	11,6	35	93	13,7	72	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
178	2,4%	0,0%	F	40	RJ	77,0	4,88	12,9	37,6	112	14,3	66	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
179	2,8%	0,0%	F	6	SP	71,5	4,99	11,7	35,7	139	13,7	60	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
180	2,5%	0,0%	M	9	RJ	66,7	5,34	11,4	35,6	56	14,9	58	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
181	2,8%	0,0%	F	6	RJ	70,9	5,19	12,3	36,8	65	14,1	58	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
182	2,8%	1,3%	M	2	SP	66,4	5,68	12,6	37,7	32	13,6	48	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
183	3,4%	0,0%	F	11	RJ	64,4	5,56	12,7	35,8	92	14,7	48	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	

185	3,0%	0,0%	M	5	RJ	72,9	5,02	12,5	36,6	26	14,6	62	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
186	2,5%	0,0%	M	6	SP	74,1	5,21	12,6	38,6	25	13,6	59	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
187	2,4%	0,0%	F	41	SP	69,7	5,51	12,0	38,4	30	14,2	57	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
188	2,7%	0,0%	M	14	SP	74,0	5,69	14	42,1	48	14,0	55	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
189	2,6%	0,0%	F	20	RJ	79,6	4,11	10,7	32,7	27	15,0	89	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
190	2,6%	0,0%	F	27	SP	75,5	4,73	11,8	35,7	60	13,3	64	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
191	2,8%	0,0%	M	11	RJ	74,6	4,8	11,8	35,8	84	14,8	70	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
192	2,9%	0,4%	M	13	SP	77,7	5,29	14,4	41,1	30	13,3	56	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
193	2,9%	0,3%	M	7	SP	74,9	4,71	12,1	35,3	54	14,6	68	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
194	2,6%	0,0%	F	6	SP	77,3	4,97	12,7	38,4	82	12,7	60	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
201	2,7%	0,0%	F	29	RJ	79,6	4,27	10,9	34	66	13,2	77	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
202	2,4%	0,0%	F	18	SP	67,2	5,28	11,3	35,5	51	13,7	55	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
203	2,1%	0,0%	F	15	RJ	66,4	4,35	7,6	28,9	32	29,8	173	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
204	2,5%	0,0%	F	51	BA	72,9	5,38	12,3	39,2	24	16,8	73	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
205	2,7%	0,0%	M	4	RS	70,9	4,95	12,1	35,1	127	15,4	64	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
206	2,4%	0,0%	F	48	RS	71,2	5,39	12,2	38,4	99	13,4	56	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
217	2,4%	0,7%	F	33	RJ	74,4	4,34	10,1	32,3	155	25,2	138	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
218	2,5%	0,0%	M	10	RJ	64,8	5,6	11,6	36,3	51	16,1	58	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
219	3,0%	0,0%	F	20	RJ	78,5	4,24	11,1	33,3	47	14,5	80	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
220	2,7%	0,0%	F	7	SP	75,8	4,87	12,8	36,9	52	12,1	54	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
221	2,8%	0,0%	M	8	SP	75,8	4,72	11,7	35,8	126	13,1	64	ALFA 4.2 EM HETEROZIGOSE	POSITIVO ALFA 4.2 HETEROZIGOSE
222	2,7%	0,0%	F	21	SP	79,7	4,88	12,9	38,9	119	13,7	67	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
223	2,6%	0,0%	F	45	RJ	65,7	5,07	10,9	33,3	119	15,9	63	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
224	2,6%	0,0%	F	56	RJ	68,3	5,08	11,0	34,7	115	15,8	67	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
225	2,8%	0,0%	F	6	SP	78,0	5,14	14,6	40,1	33	12,8	53	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
226	2,4%	0,0%	M	44	SP	75,1	5,67	12,5	42,6	158	15,2	69	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
227	2,5%	0,0%	F	55	RS	78,5	5,21	13,5	40,9	117	14,6	67	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
228	2,3%	0,0%	M	14	PE	73,4	4,88	11,8	35,8	76	16,3	74	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
229	2,5%	0,0%	F	31	RJ	70,2	5,3	12,1	37,2	90	16,0	65	ALFA 3.7/4.2 EM HETEROZIGOSE	POSITIVO ALFA 3.7/4.2 HETEROZIGOSE
230	2,7%	0,0%	M	5	SP	71,2	5,21	12,3	37,1	42	13,5	56	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
236	2,3%	0,0%	F	9	SP	65,1	6,05	13,0	39,4	65	15,8	52	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
237	2,8%	0,0%	M	6	SP	72,7	5,45	12,7	39,6	36	14,9	62	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
238	2,7%	0,0%	F	7	SP	76,3	5,61	13,8	42,8	35	13,1	55	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
239	2,4%	0,0%	M	26	SP	72,3	6,47	15,5	46,8	66	15,6	53	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
240	2,6%	0,0%	F	39	SP	71,8	4,83	11,2	34,7	30	14,9	69	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
241	2,7%	0,0%	F	35	SP	80,0	4,46	11,8	35,7	25	18,8	102	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
242	2,8%	0,0%	F	9	RJ	77,2	4,61	13,0	35,6	52	12,7	58	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO

243	2,5%	0,0%	M	12	RJ	71,4	5,03	11,1	35,9	85	17,0	78	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
244	2,7%	0,0%	F	37	RJ	78,4	4,87	12,2	38,2	96	14,1	71	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
247	2,7%	0,0%	M	34	RJ	72,5	5,82	15,0	42,2	172	14,7	52	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
248	2,7%	0,0%	F	28	RJ	78,8	4,44	11,5	35,0	27	13,3	72	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
249	2,1%	0,0%	F	71	RJ	70,1	3,58	7,7	25,1	34	19,6	125	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
250	3,0%	0,0%	F	8	SP	73,1	4,72	12,2	34,5	64	13,0	57	GAP - PCR NEGATIVO	POSITIVO -ααα anti 3.7
251	2,4%	0,0%	F	6	SP	70	5,93	13,9	41,5	50	13,5	48	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
252	2,5%	0,0%	F	17	SP	77,8	4,72	11,6	36,7	32	14,7	77	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
253	2,6%	0,0%	F	58	SP	77,7	4,61	11,9	35,8	104	13,9	71	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
254	2,9%	1,5%	F	17	SP	80,7	4,40	11,6	35,5	66	14,0	79	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
258	2,9%	0,0%	M	2	RS	70,3	5,58	13,2	39,2	30	16,8	63	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
259	2,8%	1,0%	F	2	SP	67,1	4,98	11,0	33,4	47	13,4	55	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
260	2,5%	0,0%	F	51	RJ	69,4	5,76	12,6	40,0	155	14,6	56	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
261	2,3%	0,5%	F	9	SP	74,5	4,99	17,7	37,2	55	13,9	44	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
262	2,4%	0,0%	F	83	RS	75,4	3,53	8,0	26,6	77	15,4	109	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
263	2,5%	0,0%	F	40	SP	77,8	4,73	12,3	36,8	30	14,4	71	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
270	2,8%	0,4%	M	2	PR	70,1	5,12	11,7	35,9	11	15,0	63	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
271	2,7%	0,0%	M	7	SP	75,2	5,28	13,5	39,7	66	12,9	54	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
272	2,9%	0,0%	M	6	PR	74,4	4,97	11,9	37,0	36	14,5	67	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
273	2,5%	0,0%	M	37	RJ	76,9	5,27	13,0	40,5	190	15,0	68	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
274	2,8%	1,9%	F	2	RJ	69,3	4,96	11,5	33,4	42	13,7	57	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
275	2,6%	0,0%	F	61	PR	79,2	5,49	13,9	43,5	57	16,8	76	GAP - PCR NEGATIVO	POSITIVO ALFA 3.7 HETEROZIGOSE
276	2,7%	0,0%	F	21	RJ	80,3	4,88	12,8	39,2	26	14,4	73	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
277	2,6%	0,0%	M	14	RJ	70,9	5,56	13,0	39,4	48	14,4	56	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
278	2,5%	0,0%	F	15	RJ	73,8	4,58	10,8	33,8	44	13,8	70	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
279	2,4%	0,0%	F	10	SP	77,4	5,22	13,7	40,4	52	13,5	59	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
280	2,7%	0,0%	F	36	SP	73,3	4,94	11,5	36,2	104	14,8	69	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
281	2,7%	0,0%	M	8	SP	75,0	5,44	13,6	40,8	58	13,8	57	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
282	2,2%	0,0%	F	41	RJ	76,7	4,98	12,2	38,2	103	13,9	67	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
286	2,7%	0,3%	F	28	SP	81,0	4,22	11,8	34,2	114	13,5	75	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
295	3,3%	0,4%	M	11	BA	76,5	5,31	13,5	40,6	41	14,6	63	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
296	2,9%	0,3%	M	17	SP	79,1	5,26	14,8	41,6	153	13,4	57	GAP - PCR NEGATIVO	POSITIVO -ααα anti 3.7
297	2,8%	0,0%	F	5	SP	70,3	5,48	12,7	38,5	59	14,4	56	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
298	2,2%	0,0%	M	70	SP	73,1	4,53	10,3	33,1	69	18,1	94	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
299	2,5%	0,0%	F	32	SP	68,9	5,24	11,6	36,1	98	17,0	70	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
300	3,0%	0,0%	M	6	SP	75,0	5,23	13,1	39,2	31	14,3	61	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
301	2,8%	0,0%	M	28	SP	79,4	5,67	15,6	45,0	221	12,9	52	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO

308	2,6%	0,0%	F	55	SP	77,1	4,19	10,7	32,3	88	14,3	79	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
309	2,6%	0,0%	M	43	SP	75,2	5,76	14,7	43,3	117	14,8	57	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
310	2,8%	0,0%	F	20	RS	78,6	5,09	13,0	40,0	44	14,3	68	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
311	2,4%	0,0%	F	17	PE	78,2	4,45	11,0	34,8	54	16,3	91	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
312	2,9%	0,0%	F	7	SP	73,9	4,95	12,1	36,6	80	13,7	62	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
313	2,5%	0,0%	F	64	SP	78,8	4,16	10,3	32,8	117	16,2	98	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
318	2,2%	0,0%	M	17	SP	79,6	5,54	14,7	44,1	71	14,6	63	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
319	2,1%	0,0%	F	46	RJ	76,7	4,76	10,4	36,5	81	28,6	162	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
320	2,3%	0,0%	F	67	SP	80,7	4,14	11,0	33,4	86	17,3	102	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
321	2,3%	0,0%	F	71	SP	77,4	5,04	12,5	39,0	73	20,2	97	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
322	2,7%	0,0%	M	13	RS	79,8	4,89	13,9	39,0	70	12,8	59	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
323	2,7%	0,3%	M	3	RJ	71,0	4,86	11,2	34,5	66	14,7	66	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
327	2,3%	0,0%	F	19	SP	80,2	5,31	13,7	42,6	26	16,1	76	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
328	2,6%	0,6%	M	39	SP	79,1	5,84	15,9	46,2	47	13,7	54	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
332	2,7%	0,0%	M	10	SP	75,8	5,59	14,3	42,4	65	13,9	56	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
333	2,8%	0,5%	F	4	SP	71,0	4,65	11,0	33,0	48	14,9	68	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
334	2,9%	0,0%	F	37	SP	78,9	4,73	13,0	37,3	38	14,7	70	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
335	2,5%	0,0%	F	47	SP	75,4	5,01	11,7	37,8	41	15,6	76	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
340	2,7%	0,0%	M	7	SP	74,5	5,48	13,6	40,8	53	13,2	54	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
341	2,3%	0,0%	F	41	SP	72,5	4,88	11,6	35,4	64	14,6	66	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
342	2,8%	0,0%	F	2	RJ	68,2	4,78	10,2	32,6	22	15,1	69	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
343	2,4%	0,0%	F	53	RJ	80,1	4,52	11,2	36,2	83	14,8	85	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
348	2,6%	0,0%	M	10	BA	70,1	5,28	11,7	37,0	89	14,2	60	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
349	2,9%	0,3%	M	2	SP	70,4	5,34	12,7	37,6	32	14,7	57	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
350	2,9%	0,0%	F	50	SP	79,7	4,78	12,5	38,1	38	14,3	73	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
351	2,3%	0,0%	F	76	RS	80,3	4,58	11,8	36,8	62	15,0	82	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
352	2,5%	0,0%	M	8	RJ	69,0	5,52	11,7	38,1	33	13,4	55	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
353	2,5%	0,0%	F	27	SP	78,8	4,01	10,4	31,6	89	14,8	88	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
357	2,4%	0,0%	F	59	SP	68,6	5,10	11,4	35,0	71	15,5	64	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
358	2,6%	0,0%	F	51	RJ	68,7	5,50	11,9	37,8	150	18,3	73	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
359	2,7%	0,0%	F	38	SP	80,0	5,00	13,0	40,0	46	14,0	69	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
363	3,0%	0,0%	M	10	SP	75,0	5,32	13,8	39,9	59	13,3	54	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
364	2,6%	0,0%	F	39	SP	79,7	4,73	12,6	37,7	40	15,1	76	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
365	2,7%	0,0%	F	21	SP	78,0	5,04	12,6	39,3	36	15,1	73	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
370	3,4%	0,0%	M	11	SP	67,1	5,95	14,5	39,9	62	14,2	44	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
371	2,5%	0,0%	F	15	SP	76,1	5,24	13,5	39,9	17	12,8	55	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
372	2,5%	0,0%	F	7	SP	72,4	5,62	13,9	40,7	20	12,7	48	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	

373	2,4%	0,0%	F	32	SP	76,5	4,60	11,3	35,2	67	15,6	81	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
374	2,7%	0,0%	M	6	SP	72,1	5,41	12,8	39,0	59	13,8	56	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
375	2,6%	0,0%	F	7	SP	72,1	5,51	13,4	39,7	17	12,6	49	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
376	2,5%	0,4%	M	6	SP	73,4	5,23	12,5	38,4	46	14,5	62	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
377	2,4%	0,0%	F	57	SP	67,6	5,34	11,6	36,1	106	15,4	61	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
378	3,1%	0,0%	M	12	SP	77,4	4,60	12,0	35,6	110	13,6	68	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
385	2,9%	0,0%	F	2	RS	71,9	4,52	10,4	32,5	14	15,8	79	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
386	2,1%	0%	F	73	PR	61,0	4,44	7,7	27,1	56	20,1	97	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
387	2,4%	0,0%	F	60	SP	65,2	5,57	11,7	36,3	64	17,3	63	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
388	2,7%	0,0%	F	37	SP	80,7	5,17	13,3	41,7	140	12,5	61	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
389	3,0%	0,9%	F	33	SP	79,4	4,23	11,0	33,6	52	13,3	76	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
390	2,4%	0,0%	M	28	SP	67,2	5,39	12,0	36,2	225	16,0	60	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
391	2,5%	0,0%	M	31	SP	77,2	5,43	14,2	41,9	103	13,0	55	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
392	1,1%	0,0%	F	13	SP	71,7	5,27	12,1	37,8	15	16,3	69	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
394	2,6%	0,0%	M	81	SP	69,5	4,40	9,5	30,6	238	17,4	88	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
395	2,2%	0,0%	M	50	SP	79,6	5,58	15,4	44,4	212	14,3	59	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
396	2,3%	0,0%	F	59	SP	78,9	5,82	15,4	45,9	57	14,8	60	GAP - PCR NEGATIVO	POSITIVO -αα anti 3.7
397	2,8%	0,0%	F	38	RJ	75,1	4,78	11,0	35,9	154	13,6	70	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
398	2,3%	0,0%	M	26	SP	75,6	5,79	14,8	43,8	173	14,4	56	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
407	2,9%	0,0%	F	27	SP	76,8	5,39	14,2	41,4	35	13,1	54	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
408	2,3%	0,0%	M	45	RJ	72,1	5,67	13,0	40,9	237	15,1	60	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
409	2,7%	0,0%	M	11	SP	76,0	4,84	12,2	36,8	33	13,8	65	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
410	2,9%	0,0%	M	11	BA	71,7	4,94	11,1	35,4	70	15,8	73	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
411	2,7%	0,6%	F	25	SP	78,5	5,02	12,9	39,4	32	13,5	64	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
412	3,0%	0,0%	M	2	RJ	69,5	5,21	11,6	36,2	47	16,3	68	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
418	2,2%	0,0%	F	34	SP	77,2	4,73	11,8	36,5	53	14,9	75	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
419	2,6%	0,0%	F	40	RS	68,5	5,34	11,7	36,6	43	14,8	59	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
420	2,8%	0,0%	F	41	RJ	79,1	4,78	12,2	37,8	112	15,9	82	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
421	2,5%	0,0%	M	19	BA	66,6	6,37	13,6	42,4	195	17,1	56	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
422	2,3%	0,0%	M	17	RJ	79,3	5,98	15,4	47,4	82	13,4	55	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
423	2,5%	0,0%	F	17	SP	74,6	5,15	12,5	38,4	32	14,1	63	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
424	2,6%	0,0%	F	26	PE	78,9	4,55	11,9	35,9	29	14,5	76	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
425	2,7%	0,0%	F	14	RJ	76,7	5,45	12,7	41,8	41	14,3	66	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
426	2,8%	1,1%	M	4	SP	62,4	5,03	10,1	31,4	39	15,4	59	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
427	2,5%	0,0%	F	78	SP	80,6	4,48	11,9	36,1	69	14,7	80	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
428	2,5%	0,0%	F	48	SP	79,7	4,87	12,3	38,8	57	15,0	77	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
429	2,5%	0,0%	F	25	SP	74,0	4,97	11,8	36,8	34	14,2	66	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	

432	2,1%	0,0%	M	38	RJ	71,3	5,67	12,5	40,4	87	15,5	63	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
433	2,6%	0,0%	F	4	SP	68,0	5,34	12,0	36,3	14	14,8	57	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
434	2,4%	0,0%	F	48	RJ	75,0	5,53	13,4	41,5	30	15,3	64	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
435	2,2%	0,4%	F	66	SP	79,9	4,78	12,9	38,2	108	13,9	69	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
436	2,2%	0,0%	F	74	SP	78,5	4,33	10,7	34,0	71	15,4	89	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
437	2,6%	0,0%	F	16	SP	78,5	5,22	13,5	41,0	58	13,0	59	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
438	2,5%	0,9%	M	11	SP	76,1	4,26	11,7	32,4	74	19,5	97	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
446	2,7%	0,0%	M	14	RJ	69,2	6,10	13,2	42,2	131	14,9	54	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
447	2,6%	0,0%	F	44	SP	76,0	5,33	13,5	40,5	40	14,9	64	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
448	2,4%	0,0%	F	20	PR	70,4	5,70	12,6	40,1	47	19,5	77	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
449	2,4%	0,0%	M	13	SP	78,6	4,9	12,9	38,5	52	13,4	64	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
450	2,6%	0,5%	M	5	SP	68,6	5,41	12,7	37,1	86	14,2	53	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
451	2,6%	0,0%	M	3	SP	70,9	4,44	10,3	31,5	24	14,1	69	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
452	2,9%	0,0%	F	11	SP	77,6	4,96	12,8	38,5	70	12,9	61	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
453	2,4%	0,0%	F	15	RS	78,5	4,37	10,7	34,3	32	14,8	85	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
454	2,5%	0,0%	F	38	SP	76,3	4,76	12,0	36,3	41	14,7	71	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
461	2,5%	0,9%	M	5	BA	73,6	4,81	12,0	35,4	62	13,6	61	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
462	2,4%	0,0%	F	21	RJ	71,4	5,00	11,4	35,7	70	14,8	66	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
463	2,6%	0,0%	F	33	RJ	70,0	5,30	11,4	37,1	27	17,0	73	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
464	3,0%	0,4%	F	2	SP	72,2	4,71	11,1	34,0	33	14,6	69	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
465	2,6%	0,0%	F	43	SP	66,1	5,07	10,6	33,5	101	15,2	63	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
473	2,2%	0,0%	F	35	RJ	76,4	4,99	11,7	38,1	37	16,3	81	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
474	2,2%	0,4%	F	36	SP	67,0	4,42	9,7	29,6	93	17,3	80	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
475	2,5%	0,0%	F	53	SP	78,4	5,09	13,0	39,9	127	19,9	94	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
481	2,2%	0,0%	F	39	SP	75,8	5,12	12,3	38,8	38	20,7	97	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
482	2,6%	0,0%	M	10	RJ	64,7	5,61	11,7	36,3	100	16,6	59	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
483	2,8%	0,0%	F	58	RJ	75,3	5,11	12,9	38,5	49	15,3	67	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
484	3,0%	0,0%	M	10	SP	75,4	5,40	13,8	40,7	68	12,9	53	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
485	2,9%	0,0%	F	65	RJ	71,7	4,42	9,1	31,7	35	19,6	111	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
486	2,8%	0,5%	M	30	PE	73,3	5,39	12,4	39,5	105	14,6	63	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
487	2,4%	0,6%	F	29	RJ	71,8	5,77	12,4	41,4	37	15,9	66	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	
488	3,1%	0,0%	M	13	SP	78,2	4,99	14,2	39,0	87	13,3	57	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
489	2,7%	0,0%	M	5	RS	73,1	5,54	12,1	33,2	32	14,3	63	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
490	3,1%	0,0%	M	14	SP	78,9	5,46	15,6	43,1	101	13,4	53	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
491	2,7%	0,0%	F	38	BA	80,4	4,29	11,8	34,5	86	13,9	76	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO
492	2,8%	0,0%	F	39	SP	79,4	4,94	12,4	39,2	43	14,5	74	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
498	2,3%	0,0%	F	40	RJ	77,7	3,86	9,3	30,0	40	16,4	106	GAP - PCR NEGATIVO	MLPA- NEGATIVO

499	2,9%	0,6%	F	5	RJ	72,3	4,15	9,9	30,0	44	14,4	76	ALFA 3.7 EM HETEROZIGOSE	
500	2,6%	0,0%	F	61	BA	68,9	5,27	11,3	36,3	83	15,5	65	ALFA 3.7 EM HOMOZIGOSE	

Apêndice 2 – Dados e resultados dos pacientes com suspeita de beta-talassemia

FICHA	HbA2	HbF	SEXO	IDADE	ESTADO	VCM	GV	Hb	Ht	RDW	Green e King	RESULTADO SEQUENCIAMENTO BETA
1	4,0%	0,0%	M	59	SP	70,9	6,22	14,6	44,1	15,2	52	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
2	3,8%	0,5%	F	81	RJ	69,7	4,66	10,8	32,5	14,3	64	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
3	5,4%	0,7%	M	44	SP	59,3	5,85	11,4	34,7	16,5	51	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
4	5,0%	1,2%	M	13	SP	61,9	6,43	12,9	39,8	15,4	46	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
5	6,2%	0,0%	F	30	SP	66,6	5,00	10,7	33,3	14,5	60	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
6	5,6%	1,6%	F	28	SP	59,6	6,06	11,8	36,1	16,8	51	IVS-II-1 (c.315+1 G>A) heterozigose
7	5,3%	1,9%	F	32	SP	62,1	4,93	9,9	30,6	15,9	62	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
14	5,7%	0,0%	F	61	SP	60,8	5,67	10,9	34,5	17,1	58	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
15	5,6%	0,7%	F	6	PE	59,7	5,71	11,0	34,1	17,2	56	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
16	5,9%	1,3%	F	31	SP	63,9	4,93	9,6	31,5	15,7	67	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
17	5,1%	0,8%	M	33	PE	64,3	6,41	13,7	41,2	17,5	53	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
20	4,2%	0,0%	M	66	RS	70,1	6,09	14,1	42,7	16,4	57	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
21	5,4%	1,5%	F	27	SP	64,7	5,15	10,6	33,3	15,3	60	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
22	4,7%	0,0%	M	13	SP	66,9	5,28	11,6	35,3	16,1	62	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
23	5,5%	0,5%	F	76	SP	62,4	4,39	8,6	27,4	17,4	79	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
31	4,9%	0,7%	F	59	RJ	51,4	4,73	6,8	24,3	20,3	79	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
32	5,2%	0,0%	M	32	SP	68,7	5,81	12,6	39,9	14,0	52	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
33	4,2%	0,0%	F	84	RS	70,7	4,95	11,8	35,0	14,8	63	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
37	5,1%	0,0%	F	26	SP	60,0	5,72	10,9	34,3	14,8	49	Códon 44 (c.135 delC) heterozigose
38	5,5%	0,0%	M	57	SP	64,6	6,66	14,2	43,0	16,2	48	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
39	5,4%	0,9%	F	17	SP	62,8	5,62	11,3	35,3	16,0	56	IVS-II-1 (c.315+1 G>A) heterozigose
40	4,5%	0,0%	F	63	SP	59,2	6,22	11,6	36,8	16,4	50	IVS-I-1 (c.92+1 G>A) heterozigose
46	3,7%	0,0%	F	38	SP	74,0	5,08	11,8	37,6	14,4	67	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
47	5,6%	0,6%	F	45	SP	61,2	5,33	10,4	32,6	15,9	57	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
48	5,5%	0,0%	M	11	SP	56,3	6,52	11,8	36,7	15,9	43	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
49	5,5%	0,6%	F	38	SP	61,8	5,57	10,9	34,4	16,4	57	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
50	5,0%	0,0%	M	76	SP	60,9	5,19	10,0	31,6	16,3	60	IVS-I-1 (c.92+1 G>A) heterozigose
51	4,4%	0,0%	M	12	SP	71,6	5,32	11,9	38,1	16,1	69	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
52	5,0%	1,2%	F	62	SP	63,8	5,16	10,6	32,9	15,7	60	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
53	4,5%	0,3%	F	47	RS	68,2	4,65	10,3	31,7	15,3	69	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
54	4,3%	1,0%	F	2	RS	65,7	4,87	10,6	32,0	15,0	61	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
55	5,2%	0,6%	M	8	SP	60,0	5,73	10,9	34,4	16,0	53	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
56	5,8%	1,0%	F	9	SP	55,7	5,76	10,4	32,1	16,3	49	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
69	5,8%	0,0%	F	87	RS	61,6	5,16	10,4	31,8	16,3	59	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
70	5,3%	0,4%	F	66	SP	63,4	5,19	10,5	32,9	16,3	62	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
71	4,2%	0,0%	F	33	RJ	72,8	4,75	11,4	34,6	13,8	64	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
72	3,9%	0,7%	F	7	PR	64,0	5,56	11,8	35,6	15,9	55	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
73	4,9%	1,6%	M	2	RJ	59,5	5,36	10,4	31,9	16,7	57	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
81	5,8%	0,0%	M	14	RJ	60,4	5,65	10,8	34,1	17,5	59	IVS-I-5 (c.92+5 G>A) heterozigose
82	3,9%	0,0%	M	31	SP	68,2	6,26	14,0	42,7	15,7	52	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
83	5,1%	2,0%	F	39	SP	61,9	5,43	11,1	33,6	15,7	54	IVS-I-1 (c.92+1 G>A) heterozigose
84	4,8%	0,4%	M	38	PR	62,9	6,65	14,1	41,8	18,4	52	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
93	4,4%	0,0%	F	23	RJ	71,8	3,83	9	27,5	15,3	88	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
94	5,1%	1,2%	F	64	SP	66,9	5,04	11,1	33,7	16,0	65	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
98	4,3%	0,0%	M	9	RJ	65,8	5,62	12,1	37,0	16,7	60	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
99	5,7%	0,0%	M	27	SP	62,6	6,13	12,7	38,4	14,8	46	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
100	4,2%	0,0%	F	33	SP	68,2	5,16	11,5	35,2	15,2	61	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
101	5,0%	0,5%	F	40	SP	64,5	4,53	9,0	29,2	15,9	73	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
102	4,1%	0,6%	F	59	SP	77,5	3,51	8,7	27,2	20,1	139	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
103	5,1%	0,4%	F	30	SP	65,1	5,36	10,9	34,9	14,9	58	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose

112	4,6%	1,0%	M	38	RJ	61,6	6,15	13,0	37,9	15,3	45	IVS-I-5 (c.92+5 G>A) heterozigose
113	5,2%	1,3%	F	31	RS	59,8	5,80	10,6	34,7	15,3	52	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
114	5,4%	1,1%	M	32	SP	57,5	6,37	11,9	36,6	16,4	46	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
115	4,7%	0,0%	F	23	SP	61,3	5,64	10,9	34,6	18,0	62	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
116	4,9%	0,0%	F	52	SP	60,9	5,96	11,1	36,3	17,0	57	IVS-I-1 (c.92+1 G>A) heterozigose
117	6,1%	0,0%	M	11	SP	55,7	6,39	11,3	35,6	15,6	43	Códon 15 (c.48 G>A) heterozigose
129	4,1%	0,7%	F	3	SP	60,1	5,97	12,0	35,9	16,5	50	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
130	6,1%	0,0%	F	46	SP	62,8	5,51	11,4	34,6	15,7	54	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
131	4,0%	0,0%	F	36	RJ	68,5	4,89	11,1	33,5	14,5	61	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
136	5,3%	0,7%	M	51	SP	62,7	6,08	12,7	38,1	16,4	51	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
137	4,1%	0,0%	F	35	SP	76,0	4,63	11,3	35,2	14,8	76	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
138	5,6%	1,8%	F	31	SP	59,7	5,53	10,7	33,0	16,4	55	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
139	5,0%	0,4%	F	61	SP	60,6	5,97	12,0	36,2	16,1	49	IVS-I-1 (c.92+1 G>A) heterozigose
144	4,9%	0,0%	F	55	SP	66,2	5,45	11,5	36,1	16,0	61	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
145	5,2%	0,4%	M	44	SP	62,7	6,79	13,9	42,6	17,2	49	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
146	5,9%	1,4%	F	10	SP	60,7	5,65	10,8	34,3	16,0	55	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
147	4,8%	0,6%	F	70	SP	55,6	5,88	10,4	32,7	17,6	52	IVS-I-1 (c.92+1 G>A) heterozigose
148	5,8%	0,0%	F	53	BA	59,2	5,56	10,4	32,9	16,8	57	Códon 47 (c.143_144 ins A)
149	4,9%	0,0%	F	38	SP	64,6	4,78	10,2	30,9	15,3	63	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
159	4,9%	0,6%	F	81	SP	66,6	4,7	10,4	31,3	15,8	67	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
160	5,4%	1,7%	F	25	SP	57,1	5,46	10,0	31,2	17,0	55	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
161	5,2%	0,5%	F	27	SP	60,3	5,27	10,4	31,8	15,5	54	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
167	5,6%	1,2%	F	29	SP	63,1	4,91	9,8	31,0	18,1	74	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
168	4,2%	0,0%	F	36	SP	71,9	5,41	12,2	38,9	14,5	61	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
169	5,3%	0,0%	M	36	RJ	61,0	5,34	10,2	32,6	15,3	56	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
170	6,3%	0,8%	M	3	SP	54,2	5,92	10,5	32,1	16,7	47	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
171	5,2%	0,7%	M	31	SP	63,0	6,6	13,5	41,6	17,4	51	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
172	5,0%	0,8%	F	30	SP	69,2	5,52	12,1	38,2	15,8	63	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
184	5,4%	0,7%	F	24	SP	64,1	4,65	9,7	29,8	16,3	69	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
195	5,3%	0,0%	F	7	RS	59,0	6,86	13	40,5	15,3	41	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
196	5,9%	0,0%	M	80	SP	72,9	5,98	14,4	43,6	15,7	58	NEGATIVO
197	5,1%	0,0%	M	49	SP	61,7	5,87	11,8	36,2	15,7	51	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
198	5,9%	1,9%	M	35	SP	62,3	5,73	11,2	35,7	17,9	62	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
199	5,1%	0,0%	F	60	RS	60,3	4,94	9,6	29,8	16,2	61	Códon 8 (-AA) (c.25_26 del AA) heterozigose
200	6,1%	1,2%	M	34	RJ	61,8	6,51	13,1	40,2	17,4	51	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
207	5,4%	0,0%	M	7	SP	55,5	6,02	10,9	33,4	16,6	47	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
208	5,1%	0,0%	F	41	SP	63,5	5,04	10,2	32,0	15,2	60	NEGATIVO
209	5,8%	1,0%	M	10	RS	59,0	5,41	10,1	31,9	17,0	59	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
210	5,3%	1,2%	F	42	RJ	64,3	5,02	10,2	32,3	15,8	64	NEGATIVO
211	4,8%	1,4%	F	43	PR	65,3	5,62	12,0	36,7	15,9	56	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
212	5,6%	0,0%	F	34	SP	57,4	5,61	10,3	32,2	16,3	52	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
213	5,7%	0,8%	M	34	SP	60,9	6,09	12,0	37,1	18,0	56	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
214	5,9%	1,1%	M	13	SP	57,5	7,17	13,2	41,2	16,8	42	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
215	5,3%	0,0%	F	9	SP	58,5	6	11,1	35,1	15,0	46	IVS-I-5 (c.92+5 G>A) heterozigose
216	4,2%	0,6%	F	34	SP	66,3	5,17	11,1	34,3	14,8	59	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
231	4,5%	0,0%	M	73	SP	72,4	5,14	12,1	37,2	15,2	66	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
232	4,2%	0,0%	F	36	SP	58,5	6,27	11,6	36,7	18,6	55	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
233	5,2%	0,7%	F	35	RJ	58,2	6,22	11,7	36,2	17,8	52	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
234	5,9%	1,3%	F	74	SP	64,8	5,29	11,0	34,3	16,5	63	Códon 15 (c.48 G>A) heterozigose
235	3,8%	0,0%	F	70	SP	67,1	5,01	10,6	33,6	14,9	63	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
245	5,9%	0,8%	F	26	SP	68,3	4,82	10,4	32,9	15,9	71	NEGATIVO
246	5,7%	0,0%	M	25	SP	66,3	5,69	12,4	37,7	15,2	54	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
255	5,7%	0,0%	M	34	SP	61,8	5,92	11,6	36,6	17,0	56	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
256	4,9%	0,4%	M	30	SP	59,5	6,56	12,8	39,0	16,5	46	IVS-I-2 (c.92+2 T>C) heterozigose
257	5,3%	1,4%	F	70	SP	65,3	4,26	9,0	27,8	15,8	75	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose

264	4,1%	0,0%	F	36	RJ	71,3	5,13	11,2	36,6	14,8	67	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
265	5,8%	0,9%	M	21	SP	58,3	6,04	11,3	35,2	15,8	48	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
266	5,5%	2,0%	F	21	SP	64,2	5,33	10,6	34,2	15,5	60	Códons 41/42 (-TTCT) (c.126_129 delTTCT) heterozigose
267	6,2%	1,4%	M	3	SP	53,2	5,53	9,5	29,4	17,3	52	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
268	5,4%	0,0%	F	27	SP	58,6	5,56	10,5	32,6	16,3	53	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
269	4,5%	0,3%	F	55	SP	53,8	5,72	9,3	30,8	20,7	64	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
283	4,3%	0,0%	M	60	RJ	67,1	6,01	13,3	40,3	15,0	51	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
284	4,3%	0,0%	M	40	RJ	62,5	6,02	12,0	37,6	16,7	54	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
285	6,3%	0,8%	M	49	SP	68,8	6,05	13,7	41,6	14,3	49	NEGATIVO
287	5,1%	0,3%	M	51	SP	58,3	6,05	11,6	35,3	16,8	49	IVS-I-1 (c.92+1 G>A) heterozigose
288	4,2%	1,1%	M	12	SP	65,5	5,39	11,4	35,3	14,9	56	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
289	4,3%	0,0%	F	78	SP	65,8	4,42	9,3	29,1	15,1	70	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
290	5,8%	1,7%	F	8	SP	61	5,85	11,7	35,7	15,4	49	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
291	5,7%	0,0%	F	27	SP	66,4	5,45	11,6	36,2	16,2	62	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
292	5,0%	1,0%	F	30	SP	67,8	3,76	8,2	25,5	18,0	101	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
293	4,7%	0,5%	F	14	SP	66,8	5,09	10,5	34,0	15,0	64	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
294	5,5%	0,0%	F	43	SP	59,5	5,38	10,4	32,0	18,4	63	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
302	5,2%	1,6%	F	26	SP	68,2	5,15	11,3	35,1	16,1	66	NEGATIVO
303	5,6%	0,7%	F	40	SP	61,3	5,25	10,4	32,2	15,9	57	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
304	4,0%	0,0%	F	53	RS	72,7	5,16	11,9	37,5	14,5	64	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
305	5,2%	1,2%	F	46	RJ	57,9	4,99	9,2	28,9	16,4	60	Códon 15 (c.48 G>A) heterozigose
306	6,0%	0,8%	F	4	SP	55,3	5,37	9,8	29,7	15,7	49	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
307	5,4%	0,0%	F	29	PR	61,5	6,13	12,2	37,7	17,9	55	NEGATIVO
314	6,0%	2,0%	M	11	SP	55,2	6,12	10,9	33,8	18,6	52	Códon 6 (-A) (c.20 del A) heterozigose
315	5,5%	1,1%	M	2	SP	54,3	5,98	10,4	32,5	19,3	55	IVS-I-1 (c.92+1 G>A) heterozigose
316	5,3%	1,5%	F	43	SP	62,1	5,80	11,4	36,0	16,2	55	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
317	5,6%	0,0%	F	39	SP	58,3	5,27	9,9	30,7	15,7	54	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
324	4,6%	0,3%	F	3	SP	64,4	5,95	12,8	38,3	14,1	46	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
325	5,0%	1,3%	M	46	SP	77,1	5,16	13,2	39,8	14,8	67	NEGATIVO
326	4,9%	0,4%	M	36	RS	64,2	5,65	12,0	36,3	14,8	51	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
329	4,4%	0,0%	M	53	RS	70,0	5,83	12,8	40,8	16,2	62	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
330	5,2%	0,6%	F	25	BA	61,8	5,26	10,5	32,5	16,9	61	IVS-I-129 (c.93 -2 A>G) heterozigose
331	5,0%	0,6%	F	35	SP	57,8	5,19	9,6	30,0	16,8	58	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
336	5,2%	0,0%	F	53	RS	65,2	5,14	10,6	33,5	15,5	62	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
337	4,0%	0,0%	F	30	SP	70,2	5,43	12,7	38,1	13,4	52	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
338	5,3%	0,0%	M	62	RJ	69,6	6,35	14,0	44,2	17,4	60	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
339	5,7%	1,3%	M	57	SP	59,4	6,18	12,2	36,7	15,9	46	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
344	6,0%	1,0%	F	45	RS	77,0	5,12	12,8	39,4	14,7	68	NEGATIVO
345	4,8%	0,0%	F	32	SP	61,5	5,84	11,5	35,9	15,1	50	IVS-II-1 (c.315+1 G>A) heterozigose
346	5,8%	0,0%	M	43	BA	73,0	5,97	14,4	43,6	16,6	61	NEGATIVO
347	4,7%	1,8%	F	2	SP	58,5	6,21	11,7	36,3	16,3	48	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
354	4,7%	0,0%	F	64	RJ	67,7	5,11	10,6	34,6	15,6	67	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
355	4,9%	0,0%	F	36	SP	64,8	5,48	11,7	35,5	15,9	57	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
356	4,4%	0,9%	M	5	SP	65,6	5,12	11,3	33,6	14,1	54	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
360	5,1%	0,8%	F	37	RJ	62,7	6,20	12,3	38,9	16,5	53	Códon 11 (-T) (c.36 del T) heterozigose
361	5,0%	1,0%	M	6	SP	61,6	5,83	10,9	35,9	16,0	56	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
362	5,8%	0,5%	F	20	SP	65,0	4,80	10,0	31,2	15,9	67,2	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
366	5,7%	0,4%	M	12	SP	56,5	5,82	10,6	32,9	15,8	48	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
367	5,7%	1,0%	M	33	SP	61,8	5,87	11,5	36,3	16,9	56	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
368	5,4%	0,0%	M	17	SP	56,9	6,47	12,0	36,8	16,6	45	NEGATIVO
369	4,1%	0,0%	F	5	SP	66,4	5,42	11,9	36,0	15,6	58	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
379	5,5%	0,0%	M	31	RJ	63,6	6,46	12,7	41,1	15,9	51	IVS-I-1 (c.92+1 G>A) heterozigose
380	5,4%	0,3%	M	17	SP	57,1	7,86	15,3	44,9	16,7	36	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
381	5,2%	0,5%	M	55	SP	62,6	5,80	11,7	36,3	16,4	55	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
382	5,1%	0%	F	87	SP	65,1	4,39	9,2	28,6	15,3	70	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose

383	5,4%	0%	F	67	RJ	65,3	5,51	11,1	36,0	15,1	58	IVS-II-1 (c.315+1 G>A) heterozigose
384	5,2%	1,4%	F	39	SP	64,2	5,62	11,7	36,1	25,1	88	NEGATIVO
393	3,6%	0%	M	2	SP	51,0	5,57	9,2	28,4	15,9	45	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
399	5,3%	0,0%	F	40	RS	60,4	5,02	9,4	30,3	17,8	69	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
400	5,9%	0,6%	M	30	SP	62,3	6,26	12,7	39,0	17,3	53	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
401	4,4%	0,0%	F	36	SP	73,2	4,62	10,8	33,8	14,8	73	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
402	5,2%	0,6%	F	27	SP	68,8	5,38	12,3	37,0	14,3	55	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
403	4,9%	0,9%	F	35	RS	64,2	5,50	11,1	35,3	15,4	57	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
404	5,2%	0,0%	F	12	SP	58,7	6,35	12,8	37,3	16,6	45	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
405	6,2%	1,1%	F	2	SP	54,5	5,96	10,6	32,5	16,2	45	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
406	5,5%	0,0%	F	6	SP	59,3	6,12	11,9	36,3	16,1	48	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
413	4,4%	0,0%	F	69	BA	71,5	5,23	11,8	37,4	15,2	66	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
414	5,0%	1,5%	F	37	SP	62,2	5,56	11,6	34,6	16,3	54	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
415	6,2%	0,6%	M	15	SP	55,0	7,62	13,8	41,9	17,3	38	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
416	5,1%	0,4%	M	49	RS	64,7	6,4	13,6	41,4	15,5	48	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
417	3,6%	0,0%	F	61	PE	72,8	5,19	12,0	37,8	13,8	61	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
430	5,3%	0,8%	F	29	BA	63,7	5,86	12,1	37,3	16,3	55	IVS-I-5 (c.92+5 G>A) heterozigose
431	5,6%	0,0%	M	34	SP	60,6	6,16	12,0	37,3	17,1	52	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
439	5,8%	2,0%	F	26	RJ	66,9	5,25	11,0	35,1	16,1	66	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
440	4,4%	0,9%	F	30	RS	70,2	4,8	11,1	33,7	13,8	61	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
441	6,2%	0,0%	M	30	SP	67,4	5,7	12,4	38,4	14,6	53	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
442	4,3%	0,0%	F	43	SP	68,5	5,21	11,3	35,7	14,7	61	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
443	4,9%	0,5%	F	11	SP	56,1	6,56	12,4	36,8	15,4	39	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
444	4,8%	0,0%	F	58	SP	68,8	5,22	11,6	35,9	15,3	62	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
445	5,8%	0,5%	M	5	SP	56,6	6,38	12,1	36,1	15,0	40	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
455	5,7%	0,8%	M	32	RS	61,8	6,21	12,9	38,4	16,4	49	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
456	5,7%	0,0%	M	30	SP	60,8	4,85	9,6	29,5	16,2	62	IVS-I-1 (c.92+1 G>A) heterozigose
457	4,1%	0,0%	M	28	SP	70,8	5,54	13,1	39,2	14,8	57	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
458	5,4%	0,0%	F	32	RJ	60,1	6,02	11,6	36,2	15,8	49	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
459	4,1%	0,0%	F	29	RJ	73,9	4,82	11,3	35,6	15,3	74	IVS-I-6 (c.92+6 T>C) heterozigose
460	4,5%	0,0%	M	54	SP	77,6	5,45	13,2	42,3	15,5	71	NEGATIVO
466	6,1%	0,5%	F	29	SP	64,1	5,51	11,1	35,3	15,0	56	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
467	5,3%	1,7%	M	12	SP	56,7	6,03	10,8	34,2	15,8	47	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
468	6,4%	0,3%	F	47	SP	63,3	5,47	11,3	34,6	15,6	55	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
469	6,0%	0,0%	F	28	SP	66,0	5,38	11,7	35,5	16,1	60	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
470	6,3%	0,7%	F	27	SP	63,2	5,24	10,4	33,1	15,1	58	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
471	5,9%	0,0%	M	28	SP	56,6	6,82	12,5	38,6	17,2	44	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
472	5,4%	0,5%	M	16	SP	61,3	6,36	13,1	39,0	16,5	47	NEGATIVO
476	5,2%	0,0%	F	5	PR	61,5	5,64	11,3	34,7	16,3	55	IVS-I-110 (c.93-21 G>A) heterozigose
477	5,4%	0,0%	F	7	SP	55,9	5,90	10,4	33,0	16,4	49	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
478	5,9%	1,9%	F	32	SP	61,2	5,67	11,0	34,7	15,3	52	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
479	5,7%	1,7%	M	3	SP	55,3	5,37	9,8	29,7	16,1	50	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
480	5,6%	0,0%	F	35	SP	69,2	5,17	11,3	35,8	15,0	64	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
493	6,1%	1,0%	F	17	BA	60,5	5,75	10,9	34,8	17,0	57	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
494	4,1%	0,0%	F	26	SP	60,6	5,43	10,5	32,9	15,6	55	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
495	5,6%	0,4%	M	31	SP	57,1	6,99	13,1	39,9	19,1	48	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
496	5,9%	0,0%	M	41	SP	55,2	6,63	11,6	36,6	17,3	45	CD 39 (c. 118 C>T) heterozigose
497	5,2%	1,6%	F	25	SP	62,5	4,35	8,8	27,2	15,9	71	IVS-I-1 (c.92+1 G>A) heterozigose

Apêndice 3 – Valores de referência

HEMOGRAMA (GV, HB, HT, VCM e RDW):

2 anos (sexo masculino e feminino):

GV (milhões/mm³): 4.10 - 5.10

HB (g/dL): 11.0 - 14.0

HT (mL eritroc./dL): 33.0 - 42.0

VCM (fL): 74.0 - 89.0

RDW (%): 12.0 - 14.5

3 a 5 anos:

GV (milhões/mm³):

sexo masculino: 4.10 - 5.30

sexo feminino: 4.10 - 5.20

HB (g/dL):

sexo masculino: 11.0 - 14.5

sexo feminino: 12.0 - 15.0

HT (mL eritroc./dL):

sexo masculino: 33.0 - 43.0

sexo feminino: 35.0 - 44.0

VCM (fL):

sexo masculino: 74.0 - 89.0

sexo feminino: 74.0 - 89.0

RDW (%)

sexo masculino: 12.0 - 14.0

sexo feminino: 12.0 - 14.0

6 a 11 anos:

GV (milhões/mm³):

sexo masculino: 4.20 - 5.10

sexo feminino: 4.10 - 5.30

HB (g/dL):

sexo masculino: 12.0 - 14.0

sexo feminino: 12.0 - 14.5

HT (mL eritroc./dL):

sexo masculino: 36.0 - 42.0

sexo feminino: 36.0 - 43.0

VCM (fL):

sexo masculino: 77.0 - 91.0

sexo feminino: 79.0 - 90.0

RDW (%)

sexo masculino: 11.6 - 13.4

sexo feminino: 12.0 - 14.0

12 a 16 anos:GV (milhões/mm³):

sexo masculino: 4.40 - 5.50

sexo feminino: 4.10 - 5.20

HB (g/dL):

sexo masculino: 12.8 - 16.0

sexo feminino: 12.2 - 14.8

HT (mL eritroc./dL):

sexo masculino: 37.0 - 47.0

sexo feminino: 36.0 - 43.0

VCM_(fL):

sexo masculino: 81.0 - 92.0

sexo feminino: 80.0 - 92.0

RDW (%)

sexo masculino: 11.6 - 13.8

sexo feminino: 11.2 - 13.5

Adultos (> de 16 anos):GV (milhões/mm³):

sexo masculino: 4.30 - 5.70

sexo feminino: 3.90 - 5.00

HB (g/dL):

sexo masculino: 13.5 - 17.5

sexo feminino: 12.0 - 15.5

HT (mL eritroc./dL):

sexo masculino: 39.0 - 50.0

sexo feminino: 35.0 - 45.0

VCM_(fL):

sexo masculino: 81.0 - 95.0

sexo feminino: 82.0 - 98.0

RDW (%)

sexo masculino: 11.8 - 15.6

sexo feminino: 11.9 - 15.5

FERRITINA:

de 2 a 15 anos (sexo feminino e masculino): 10 a 150 µg/L

> 16 ANOS sexo feminino: 24 a 155 µg/L

> 16 ANOS sexo masculino: 36 a 262 µg/L

ELETROFORESE DE HEMOGLOBINAS (Hb A2 e Hb F)

Acima de 2 anos:

Hb A2: 2,0 a 3,5%

Hb F: 0,0 A 2,0%

PARÂMETRO GREEN E KING:

Até 64= sugestivo de talassemia

>64= sugestivo de deficiência de ferro